

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**AGROINDUSTRIAL**



**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL**  
**DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**“OBTENCIÓN DE AGPI n-3 POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A  
PARTIR DE ACEITE SEMI-REFINADO DE ANCHOVETA  
(*Engraulis ringens*)”**

**AUTOR:**

**Bach. ENCINAS ESTRADA GREISSY STEFHANY**

**ASESOR:**

**Dr. CASTILLO CALDERÓN AUGUSTO**

**NUEVO CHIMBOTE 2021**

## Facultad de Ingeniería

### Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial

#### Informe del Asesor – Informe de Tesis para obtener el título profesional

- 1) Apellidos/Nombres: Encinas Estrada Greissy Stefhany  
(Código) 201412043
- 2) Título del Proyecto de Investigación: “OBTENCIÓN DE AGPI n-3 POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE ACEITE SEMI-REFINADO DE ANCHOVETA (*Engraulis ringens*)”
- 3) Evaluación del Contenido: Por medio de este documento, cumplo con informar que se ha procedido con la revisión de los contenidos, diseño metodológico, redacción, referencias bibliográficas y estructura exigida por la Universidad Nacional del Santa cumpliendo con la normativa vigente.
- 4) Observaciones (**Avance del 30%,60% 100%**): Avance del informe de tesis en un porcentaje de 100%.
- 5) Certificación de Aprobación: Informe de Tesis para obtener el título profesional queda **APROBADO** para continuar con el trámite correspondiente

Fecha 15 de junio del 2021



---

Dr. Augusto Castillo Calderón  
32931123

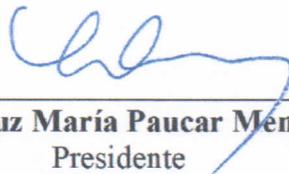


**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**  
**E.P. DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**HOJA DE AVAL DE JURADO EVALUADOR**

El presente trabajo de tesis titulado **OBTENCIÓN DE AGPI n-3 POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE ACEITE SEMI-REFINADO DE ANCHOVETA (*Engraulis ringens*)**, para obtener el título profesional de ingeniero agroindustrial, presentado por la bachiller: ENCINAS ESTRADA GREISSY STEFHANY, teniendo como asesor al Dr. Augusto Castillo Calderón, designado mediante la resolución decanal N° 598-2018-UNS-FI, ha sido revisado y aprobado el día 05 de octubre del 2021 por el siguiente jurado evaluador, designados mediante resolución N° 256-2021-UNS-CFI.



---

**Dra. Luz María Paucar Menacho**  
Presidente



---

**Br. Augusto Castillo Calderón**  
Secretario



---

**Dr. Jorge Marino Domínguez Castañeda**  
Integrante



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Siendo las 10:00 a.m., del cinco de octubre del dos mil veintiuno se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 256-2021-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dra. Luz María Paucar Menacho** (Presidente)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Secretario)
- **Dr. Jorge Marino Domínguez Castañeda** (Integrante); para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

**“OBTENCIÓN DE AGPI n-3 POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE ACEITE SEMI-REFINADO DE ANCHOVETA (*Engraulis ringens*)”, elaborada por la bachiller en Ingeniería Agroindustrial.**

**GREISSY STEFHANY ENCINAS ESTRADA**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**

Finalizada la sustentación, la Tesista respondió las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

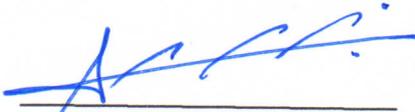
El Jurado después de deliberar sobre aspecto relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 103° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
<b>GREISSY STEFHANY ENCINAS ESTRADA</b>	<b>19</b>	<b>SOBRESALIENTE</b>

Siendo las 11:30 a.m. del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 05 de Octubre del 2021.

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Luz María Paucar Menacho**  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Augusto Castillo Calderón**  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Jorge Marino Domínguez Castañeda**  
Integrante

## **DEDICATORIA**

A mis padres Ana y Mitchel por ser mi principal motivación y apoyo incondicional en todos estos años, por enseñarme a seguir adelante a pesar de los obstáculos y no dejarme sola. A mis abuelos Matilde y Emilio por haberme guiado desde niña y darme sus sabios consejos que hicieron de mí una persona fuerte y perseverante. Gracias a todos ustedes por haberme formado y darme buenos valores y principios para lograr la persona que soy hoy en día.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme sabiduría para poder emprender este gran camino de superación, quién supo guiarme y darme fuerzas para seguir y lograr mis objetivos.

Al ingeniero Manuel Reyes Acevedo de la empresa COLPEX- Supe, por su donación de la muestra de aceite semi- refinado de pescado.

A mis profesores de la E.A.P. de Ingeniería Agroindustrial, por ser parte de mi formación profesional. En Especial al Dr. Augusto Castillo Calderón por su asesoría y dedicación, sus conocimientos, orientaciones, manera de trabajar, y su motivación han sido fundamentales para la culminación de este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. MARCO TEÓRICO .....	15
2.1 Definición aceite crudo de pescado .....	15
2.1.1 Características del aceite crudo de anchoveta.....	17
2.2 Definición de Ácidos grasos en el Aceite de Pescado.....	18
2.2.1 Ácidos Grasos Saturados.....	19
2.2.2 Ácidos Grasos Insaturados.....	20
2.2.3 Ácidos grasos Poliinsaturados Omega-3.....	24
2.3 Definición de Aceite de pescado semi-refinado.....	27
2.3.1 Características de Aceite de pescado semi-refinado .....	28
2.4 Proceso de Semi-refinación de aceite crudo de pescado .....	29
2.4.1 Desgomado.....	32
2.4.2 Neutralizado .....	33
2.4.3 Lavado y secado: .....	34
2.4.4 Blanqueado o decoloración .....	35
2.5 Enzimas Lipídicas .....	38
2.5.1 Características generales de las enzimas lipolíticas .....	38
2.5.2 Actividad Lipídica.....	39
2.5.3 Especificidad enzimática .....	39
2.6 Concentración de Ácidos Grasos Poliinsaturados por hidrolisis enzimática ....	41
2.6.1 Reacción de hidrólisis enzimática.....	41
2.6.2 Factores que afectan las reacciones catalizadas por lipasa .....	43
2.6.3 Hibernación de aceite hidrolizado.....	44

<b>2.7</b>	<b>Parámetros de calidad</b> .....	45
2.7.1	Humedad.....	45
2.7.2	Punto de fusión.....	45
2.7.3	Índice de peróxido.....	45
2.7.4	El índice de acidez.....	46
2.7.5	Índice de saponificación .....	46
2.7.6	Cromatografía de gases .....	46
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	48
3.1	Lugar de Ejecución .....	48
3.2	Materiales, equipos e instrumentos .....	48
3.3	Métodos .....	52
3.3.1	Determinación de la actividad lipídica.....	52
3.3.2	Determinación de los parámetros cinéticos .....	56
3.3.3	Determinación del efecto de la temperatura en la actividad lipídica .....	58
3.3.4	Determinación de la estabilidad térmica .....	58
3.3.5	Determinación de la inactivación Térmica .....	58
3.3.6	Determinación de análisis fisicoquímico del aceite semi-refinado de anchoveta.....	60
3.3.7	Hidrólisis Enzimática.....	64
3.3.8	Determinación del grado de hidrólisis .....	68
3.3.9	Obtención de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3.....	69
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	70
4.1	Composición fisicoquímica del aceite semi-refinado de anchoveta .....	70
4.2	Determinación de la actividad lipídica .....	72
4.3	Determinación de parámetros cinéticos .....	75
4.4	Efecto de la temperatura .....	77
4.5	Estabilidad térmica .....	79

<b>4.6</b>	<b>Inactivación térmica.....</b>	<b>81</b>
<b>4.7</b>	<b>Hidrólisis enzimática.....</b>	<b>83</b>
<b>4.8</b>	<b>Evaluación del Grado de Hidrólisis.....</b>	<b>83</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Efecto de la concentración de enzima .....</b>	<b>90</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Efecto de la temperatura .....</b>	<b>90</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Efecto del tiempo.....</b>	<b>91</b>
<b>4.9</b>	<b>Optimización del proceso de Hidrólisis enzimática .....</b>	<b>92</b>
<b>4.10</b>	<b>Caracterización fisicoquímica de los ensayos del diseño experimental.....</b>	<b>95</b>
<b>4.11</b>	<b>Concentración de ácidos grasos poliinsaturados.....</b>	<b>98</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>103</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>104</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>113</b>
	<b>ANEXO 1: Determinación del rango de linealidad y actividad lipídica de la enzima</b>	
	<b>AY AMANO 30 SD .....</b>	<b>113</b>
	<b>ANEXO 2: Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax .....</b>	<b>115</b>
	<b>ANEXO 3: Fotos del proceso de determinación de actividad enzimática.....</b>	<b>123</b>
	<b>ANEXO 4: Hidrólisis enzimática del aceite semi-refinado de anchoveta .....</b>	<b>125</b>
	<b>ANEXO 5: concentración de AGPI en Aceite hidrolizado.....</b>	<b>126</b>
	<b>ANEXO 6: Cromatograma de ácidos grasos del aceite sin concentrar.....</b>	<b>127</b>
	<b>ANEXO 7: Cromatograma de ácidos grasos del aceite concentrado .....</b>	<b>129</b>
	<b>ANEXO 8: Cromatograma de ácidos grasos del aceite concentrado duplicado .....</b>	<b>131</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Contenido de EPA y DHA en aceite crudo de diferentes especies de pescado ..	16
Tabla 2. Características fisicoquímicas del aceite crudo de anchoveta .....	18
Tabla 3. Ácidos grasos saturados comunes en grasas y aceites en la dieta humana .....	20
Tabla 4. Ácidos grasos monoinsaturados más comunes encontrados en los alimentos ...	22
Tabla 5. Relación de los principales ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's) presentes en los aceites de pescado .....	24
Tabla 6. Especificaciones industriales de calidad para el aceite de anchoveta semi-refinado .....	29
Tabla 7. Etapas del proceso de semi-refinado .....	31
Tabla 8. Preparación de concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos 'Km' y 'Vmáx' .....	57
Tabla 9. Niveles de las variables independientes usados en el diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) .....	67
Tabla 10. Ensayos del diseño experimental Compuesto Central Rotacional (DCCR), variando concentración de enzima [E], tiempo (t) y temperatura (T) .....	67
Tabla 11. Composición Físico química del aceite semi-refinado de anchoveta .....	70
Tabla 12. Composición de ácidos grasos del aceite semi-refinado de anchoveta antes del proceso de hidrólisis enzimática .....	71
Tabla 13. Reacción de velocidad de hidrólisis a diferentes concentraciones de sustrato	75
Tabla 14. Resumen de Actividad Relativa% Vs Temperatura .....	78
Tabla 15. Constante de Inactivación ( $k_d$ ) y tiempo de vida media $t_{1/2}$ .....	81
Tabla 16. Resultados experimentales del grado de hidrolisis en los 17 ensayos del diseño experimental .....	84
Tabla 17. Efecto estimado, error estándar, coeficiente t y significancia estadística para cada factor en el modelo codificado para la respuesta Grado de Hidrólisis .....	85
Tabla 18. Análisis de varianza del modelo de respuesta grado de hidrólisis .....	86
Tabla 19 . %GH teórico y experimental .....	94
Tabla 20. Ensayos con mayor GH% .....	95
Tabla 21. Análisis fisicoquímico de 8 ensayos experimentales .....	96
Tabla 22. Composición de ácidos grasos de los 8 ensayos experimentales .....	97
Tabla 23. Variación %AGP n—3 en los ensayos .....	98

<b>Tabla 24. Análisis fisicoquímico de Aceite concentrado de semi-refinado de Anchoveta</b>	100
<b>Tabla 25. Composición de ácidos grasos del aceite concentrado y el aceite antes de concentrar</b>	101
<b>Tabla 26. Experiencias para la determinación de la actividad enzimática a diferentes diluciones enzimáticas</b>	113
<b>Tabla 27. Determinación de actividad enzimática para cada dilución</b>	114
<b>Tabla 28. Experiencias para la determinación de parámetros cinéticos</b>	115
<b>Tabla 29. Inversa del sustrato vs. Inversa de la velocidad inicial</b>	115
<b>Tabla 30. Efecto de la temperatura para hallar la actividad</b>	117
<b>Tabla 31. Estabilidad térmica</b>	118
<b>Tabla 32. Inactivación Térmica</b>	119
<b>Tabla 33. Datos para hallar los parámetros de inactivación térmica gráficamente</b>	121

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Estructura química del aceite.....	15
Figura 2. Estructura molecular de un ácido graso.....	19
Figura 3. Isomería Cis – Trans de los ácidos grasos.....	21
Figura 4. Estructura del ácido graso poliinsaturado más importante en aceites vegetales (ácido linoleico) .....	23
Figura 5. Estructura química de ácidos grasos de la familia omega -3.....	26
Figura 6. Reacción química de neutralización de ácidos grasos.....	33
Figura 7. Proceso de cambio de color en el decolorado o blanqueado .....	36
Figura 8. Proceso de Semi-refinado de aceite crudo de pescado.....	37
Figura 9. Hidrólisis de un triglicérido (R representa los ácidos grasos saturados o insaturados) .....	39
Figura 10. Regioespecificidad de las lipasas. ....	41
Figura 11. Acción catalítica de las lipasas. Un triglicérido puede hidrolizarse en glicerol y ácidos grasos. ....	42
Figura 12. Esquema de trabajo en minireactor .....	52
Figura 13. Titulación con NaOH al 0.05N las muestras de hidrólisis enzimática .....	55
Figura 14. Diagrama de Flujo del Proceso Experimental .....	66
Figura 15. Curva de enfriamiento para la separación de Ácidos grasos saturados.....	69
Figura 16. Determinación del rango de linealidad a dilución 1:6000.....	73
Figura 17. Determinación del rango de linealidad a dilución 1:7000.....	74
Figura 18. Determinación del rango de linealidad a dilución 1:8000.....	74
Figura 19. Gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima AY AMANO 30 SD. ....	75
Figura 20. Concentración de sustrato Vs. Velocidad de reacción .....	77
Figura 21. Efecto de la temperatura usando enzima AY AMANO 30SD .....	78
Figura 22. Actividad relativa% de la enzima AY AMANO 30 SD.....	79
Figura 23. Estabilidad térmica de la enzima AY AMANO 30 SD .....	80
Figura 24. Gráfica para hallar los parámetros cinéticos de inactivación térmica .....	82
Figura 25. Inactivación térmica de la enzima AY AMANO 30 SD .....	82
Figura 26. Proceso de hidrólisis enzimática en el aceite semi-refinado de anchoveta .....	83
Figura 27. Aceite semi-refinado de anchoveta antes y después de la hidrólisis enzimática....	83

Figura 28. Superficies de respuesta graficadas a partir del modelo de grado de hidrolisis. ....	89
Figura 29. Perfil del valor de deseabilidad para maximizar el valor del grado de hidrólisis...	93
Figura 30. Aceite en hibernación .....	99
Figura 31. Obtención de aceite concentrado .....	99
Figura 32. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para emulsión y enzima AY AMANO 30 SD .....	116

## RESUMEN

El aceite de anchoveta (*Engraulis ringens*) se ha convertido en uno de los ingredientes marinos más valorados en el mundo por la cantidad de omega 3 lo que le ha dado un alto valor comercial en el exterior, por lo tanto, este aceite es utilizado por muchas industrias principalmente para fines nutracéuticos. Este ingrediente marino antes de ser comercializado para este fin pasa por varias etapas de transformación eliminando así impurezas que dañen la calidad del mismo y por una etapa final de concentración química que sintetiza el omega-3 para obtener altas concentraciones, convirtiéndolo así en un aceite altamente concentrado en forma de esteres metílicos que dificulta funcionalmente la absorción completa de los omega-3 en humanos.

El objetivo del presente trabajo de investigación es obtener parámetros de operación en el proceso de hidrólisis para maximizar el %GH para luego aplicar un método de concentración de omega-3 con el fin de lograr un concentrado natural y no sintético en aceite de anchoveta. Aplicando un diseño DCCR se logró la combinación de variables independientes: tiempo, temperatura y concentración de enzima para realizar las pruebas de hidrólisis teniendo los siguientes parámetros 12-48 h, 40-50°C, 200-500 U/mL<sub>aceite</sub> respectivamente.

Finalmente se obtuvieron las condiciones óptimas para lograr un alto %GH, en condiciones de mini reactor enzimático las cuales fueron: 48 Horas, 42.5 °C y 500 U/mL<sub>aceite</sub> para obtener un grado de hidrólisis de 26.91% y una concentración de omega-3 de 34.840±0.020%.

**Palabras claves:** aceite de anchoveta, hidrolisis enzimática, omega 3

## ABSTRACT

Anchovy oil (*Engraulis ringens*) has become one of the most valued marine ingredients in the world for the amount of omega 3, which has given it a high commercial value abroad, therefore, this oil is used by many industries primarily for nutraceutical purposes. Before being marketed for this purpose, this marine ingredient goes through several stages of transformation, thus eliminating impurities that damage its quality and through a final stage of chemical concentration that synthesizes omega-3 to obtain high concentrations, thus converting it into a highly concentrated in the form of methyl esters that functionally hinders the complete absorption of omega-3s for humans.

The objective of this research work is to obtain operating parameters in the hydrolysis process to maximize the% GH and then apply an omega-3 concentration method in order to achieve a natural and non-synthetic concentrate in anchovy oil. Applying a DCCR design, the combination of independent variables was achieved: time, temperature and enzyme concentration to perform the hydrolysis tests, having the following parameters 12-48 h, 40-50 ° C, 200-500 U / mL oil respectively.

Finally, the optimal conditions were obtained to achieve a high% GH, under conditions of a mini enzymatic reactor which were: 48 hours, 42.5 ° C and 500 U/mL oil to obtain a degree of hydrolysis of 26.91% and a concentration of omega-3 of 34.840±0.020%.

**Key words:** anchovy oil, enzymatic hydrolysis, omega 3

# I. INTRODUCCIÓN

El aceite de pescado se ha convertido en un producto de exportación trascendental dentro de la diversidad de productos que el Perú exporta actualmente debido a su alto valor nutricional. Está compuesto por ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3, ácido docosahexaenoico (C22:6 DHA) y ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA), estos son esenciales para nuestro consumo porque aporta beneficios nutricionales para la salud y está sólidamente demostrado en la literatura científica y recomendado por las autoridades de la salud de todo el mundo (OMS, OPS Y FAO). (Akabas y Deckelbaum, 2006)

Los ácidos grasos omega-3 se encuentran en mayor porcentaje en peces azules y muchas personas por diversos factores no lo consumen por lo que consecuentemente se convierten en deficitarios de omega-3. En tal sentido, se innovó la forma de consumir estos ácidos grasos esenciales omega-3, donde los profesionales de la salud y de alimentos colocaron en el mercado suplementos de omega-3 extraídos del aceite de pescado que se incorporarían a la dieta de aquellas personas carentes de omega-3. (Castellanos y Rodriguez, 2015)

El requerimiento de mayores concentraciones de ácidos grasos omega-3, ha motivado el desarrollo de procesos que permiten obtener altas concentraciones de ácidos grasos omega-3 ya sea de EPA o DHA o de ambos (Swanson, Block y Mousa, 2012), por lo tanto hoy en día son cuantiosas las empresas nutracéutica, farmacéuticas y de alimentos en diferentes países alrededor del mundo, las que brindan productos a los consumidores que contienen EPA/DHA en diferentes formas y concentraciones (Arterburn, Bailey y Oken, 2006), sin embargo, muchos de los suplementos de omega-3 disponibles que se ofrecen hoy en día no proporcionan los beneficios que los consumidores están esperando. Esto se debe en gran parte a procesos que se están usando en la concentración de estos ácidos grasos para fabricar suplementos de aceite de pescado sintético en forma de éster etílico, cuya diferencia estructural con respecto al aceite en

forma de triglicérido natural limita funcionalmente la absorción de los ácidos grasos esenciales omega-3. (Lopez, 2018)

Estos procesos para concentrar aceites marinos, consisten en separar los ácidos grasos de la estructura triglicéridica de los aceites marinos, transformándolos en ésteres del etanol (etil-ésteres). Este proceso se puede realizar en forma química o idealmente mediante enzimas que liberan específicamente los ácidos grasos omega-3 por su estereo especificidad desde los triglicéridos que componen el aceite. (Valenzuela, Sanhueza y Nieto, 2006) Los etil-ésteres se separan mediante un proceso de destilación molecular obteniéndose concentraciones hasta de 90% de cada ácido graso (EPA o DHA) sin embargo, existe cuestionamiento sobre la real biodisponibilidad de los ácidos grasos omega-3 en la forma de etil-ésteres, ya que estos productos son mal sustrato para las lipasas intestinales, lo que reduciría notablemente su absorción en el tubo digestivo. (Valenzuela y Valenzuela, 2014)

Como alternativa a este proceso en esta investigación se plantea otra solución que es la hidrólisis selectiva enzimática, se sabe que las lipasas catalizan las reacciones de hidrólisis y se han mostrado como una buena alternativa para obtener concentrados de AGPI como acilglicérolos los cuales se absorben mejor en el cuerpo humano por ser ésteres naturales de ácidos grasos con glicerol. (Okada y Morrisey, 2007)

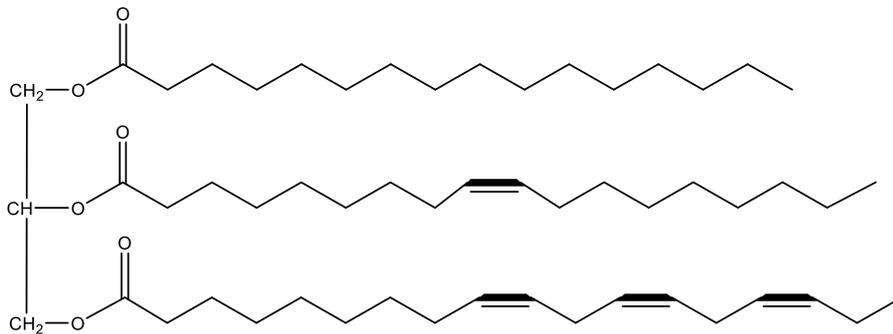
La producción de concentrados de EPA y DHA a partir de aceite de pescado aplicando lipasas demuestran tener potencial para obtener un producto de alta calidad, debido a las condiciones suaves del proceso y medioambientalmente amigables para no generar subproductos tóxicos, por esta razón se plantea en esta investigación como objetivo principal determinar los parámetros de operación de un mini reactor enzimático por lote para alcanzar el mayor grado de hidrólisis en el aceite de pescado semi-refinado aplicando una lipasa comercial.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Definición aceite crudo de pescado

El aceite crudo de pescado se obtiene de las etapas de separación y centrifugación de la producción de harina de pescado, esta fase líquida y viscosa químicamente hablando es la combinación de 3 moléculas de ácidos grasos con una molécula de glicerina. (Colpex, 2019)

La estructura química para un aceite es la siguiente:



**Figura 1. Estructura química del aceite**

*La diferencia entre un aceite y una grasa está definida por la composición cualitativa y cuantitativa de sus ácidos grasos, en especial, por la proporción de sus componentes*

El aceite de pescado crudo se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente, es de origen marino de especies como jurel, caballa, anchoveta, etc. Tiene un color amarillo anaranjado, que se obtiene después del prensado del pescado y seguido de la centrifugación para separar los diferentes componentes. (Roldán, 2016)

El aceite de pescado crudo es un producto pesquero industrial de alto valor nutricional por su alto contenido de ácidos grasos omega-3 de cadena larga; eicosapentaenoico

(C20:5, EPA), docosapentanoico (C22:5, DPA) y docosahexaenoico (C22:6, DHA). Siendo el EPA y DHA los más importantes ya que su especial disposición molecular juega un rol importante en la dieta humana, hace que tengan unos efectos terapéuticos que no poseen otros ácidos grasos: disminuyen el riesgo de padecer un infarto, reducen el nivel de triglicéridos, actúan como antiinflamatorios ante diferentes enfermedades. (Charanyaa, Belur y Regupathi, 2017).

El aceite de pescado crudo es la fuente principal de estos ácidos grasos como el EPA Y DHA, lo cual al presente ha creado una gran demanda de este insumo. La tabla 1 muestra el contenido promedio de EPA y DHA del aceite crudo obtenido de diferentes especies de peces, cuya captura, o producción (acuicultura) es común en Chile y Perú, principalmente. (Valenzuela, 2012)

**Tabla 1. Contenido de EPA y DHA en aceite crudo de diferentes especies de pescado**

ESPECIES	Valenzuela, 2012		Valenzuela, 2014		Castro-González, 2002	
	EPA (g/100 g)	DHA (g/100 g)	EPA (g/100 g)	DHA (g/100 g)	EPA (g/100 g)	DHA (g/100 g)
Jurel	14	10	5.04	6.99	-	-
Salmón	7	10.8	8.62	11.04	1	8.8
Trucha	4.5	8.6	2.59	6.77	-	-
Sardina	16	10	4.73	5.09	16	10
Anchoveta	11	10	7.63	12.92	11	10
Atún	13	10	9.1	2.37	-	-
Bacalao	11	12	-	-	-	-

Originalmente, el aceite de pescado era un subproducto de la producción de la harina de pescado, hoy en día un producto importante con alta demanda y de amplia utilización en la industria de la nutrición humana y animal. Perú, Chile, Dinamarca y Noruega, en ese orden, son los países con mayor actividad pesquera destinada a la fabricación de harina de pescado y aceite de pescado. (Valenzuela, 2012)

### **2.1.1 Características del aceite crudo de anchoveta**

Los aceites crudos presentan muchos componentes no apto para el consumo humano, tales como: fosfátidos (lecitinas), pigmentos colorantes, ácidos grasos, peróxidos, jabón, impurezas en estado coloidal (gomas). Éstos deberán ser eliminados por los procesos subsiguientes, para que el producto final pueda ser consumido. (Barreto, 2012)

Los aceites crudos de pescado tienen una composición química compleja que va a depender de diversos factores, como la estructura de sus ácidos grasos, los cuales varían considerablemente en función del tipo o especie de pescado y de la composición del plancton con el que éste se alimentó y de la época del año. Todo aquello influye en las características fisicoquímicas del aceite de pescado tanto para sus aplicaciones comestibles como en las técnicas para elaborarlo. (Roldán, 2016).

Los aceites de pescado son susceptibles a una fácil oxidación y se pueden alterar hasta rancidez durante su extracción y el almacenamiento; esta oxidación se acelera por el calor, la luz y la presencia de catalizadores y puede ser contrarrestada administrando antioxidantes, o almacenándolos en lugares oscuros. Debido a sus propiedades nutritivas, entre ellas su gran valor energético, los aceites resultan elementos indispensables en el régimen de alimentación de hombres y animales, además de que contienen vitaminas solubles A, D y E. (Roldán, 2016)

En el Perú la industria de aceite de pescado es supervisada por el Organismo Nacional De Sanidad Pesquera (SANIPES), los cuales con ayuda de INACAL establecen límites máximos y mínimos permisibles para la evaluación de calidad

del aceite de pescado como tal para su comercialización. Los análisis significativos para evaluar la calidad del aceite crudo de anchoveta se observan en la siguiente tabla:

**Tabla 2. Características fisicoquímicas del aceite crudo de anchoveta**

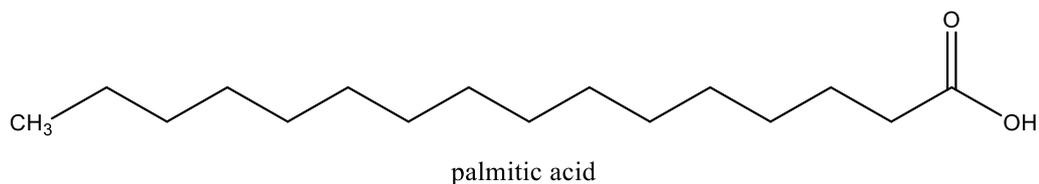
ACEITE CRUDO DE PESCADO			
Parámetros			Límites
FFA	%	Máx.	3
Humedad e impurezas	%	Máx.	1
Materia saponificable	%	Máx.	1.5
Índice de yodo	Hanus	Mín/Máx.	175 - 195
Color Gardner	Gardner	Máx.	15
Índice de saponificación	-	Mín/Máx.	186-198

Fuente: Norma Técnica Peruana NTP 312.002:1970 (Revisada el 2010)

## 2.2 Definición de Ácidos grasos en el Aceite de Pescado

Los ácidos grasos forman parte de los componentes más importantes en los aceites y las grasas, son moléculas lineales y formadas químicamente por una larga cadena de átomos de carbono y de hidrógeno teniendo en un extremo solo un grupo carboxilo. Generalmente, suelen tener un número par de átomos de carbono, pero también existen algunos ácidos grasos con número impar de carbonos, por ejemplo, el ácido margárico posee 17 átomos siendo una de las excepciones dentro del grupo de ácidos grasos. (Navas, 2010).

los ácidos grasos en su estructura química son cadenas hidrocarbonadas con fórmula  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  (donde  $n$  indica la cantidad de átomos de carbono que forman la cadena hidrocarbonada), cada átomo de carbono se une al siguiente y al precedente por medio de un enlace covalente sencillo o doble, de longitud variable que tienen un grupo metílico y uno carboxílico en sus extremos. La longitud de la cadena hidrocarbonada puede variar entre 2 a 30 o más, difieren entre sí por su longitud, por el número y posiciones de enlaces doble entre carbonos consecutivos. ( $\text{C}=\text{C}$ ). Así, los ácidos grasos pueden dividirse, según sus características estructurales, en dos grandes grupos: ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos insaturados (AGI), éstos últimos, dependiendo del grado de insaturación que posean se pueden clasificar como ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). (Navas, 2010)



**Figura 2. Estructura molecular de un ácido graso.**

Al presente, aunque se conocen más de 200 ácidos grasos. Ixtaina (2010) afirma que son pocos los que participan con un porcentaje  $> 3\%$  en la constitución de los triacilglicerolos de los aceites y grasas alimenticias. El resto, generalmente se presentan a nivel de trazas o en mayores cantidades en ciertas especies.

### **2.2.1 Ácidos Grasos Saturados**

Los ácidos grasos saturados hasta 8 carbonos se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente y se encuentran presentes principalmente en la grasa de

la leche, A partir de 12 carbonos, son sólidos y prácticamente insolubles en agua. En estado sólido, los ácidos grasos saturados adoptan la conformación alterna todo -anti, que da un máximo de simetría al cristal, por lo que los puntos de fusión son elevados. El punto de fusión aumenta con la longitud de la cadena. Los ácidos cáprico, mirístico y láurico son propios del aceite de coco y la semilla de palma, mientras que los ácidos palmítico y esteárico son los ácidos grasos saturados más usuales. (Ixtaina, 2010)

**Tabla 3. Ácidos grasos saturados comunes en grasas y aceites en la dieta humana**

<b>Ácidos Grasos</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Formula</b>	<b>Punto de Fusión (°C)</b>
Caprílico	C8:0	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	16.7
Cáprico	C10:0	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	31.6
Láurico	C12:0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	44.2
Mirístico	C14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	54.4
Palmítico	C16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	63.0
Esteárico	C18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	69.4
Araquídico	C20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	76.00
Behénico	C22:0	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	79.9
Lignocérico	C24:0	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	84.2

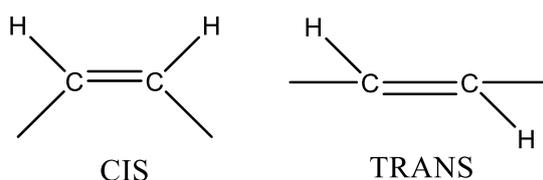
Fuente: FAO (2012)

### 2.2.2 Ácidos Grasos Insaturados

Estos ácidos grasos son muy importantes debido a que algunos de ellos son esenciales para vida de los mamíferos y especialmente para el hombre. Esto significa que el organismo no puede sintetizarlos y por lo tanto depende de la incorporación de estos ácidos grasos esenciales a través de la dieta. (Ixtaina, 2010).

Badui Dergal (2006) afirma que los ácidos grasos insaturados suelen tener una mayor reactividad química a comparación de los saturados porque tienen dobles enlaces en su estructura química. Los ácidos grasos insaturados predominan sobre los saturados, especialmente en los aceites vegetales y en las grasas de animales marinos que viven a bajas temperaturas. Su punto de fusión disminuye a medida en que aumenta el grado de insaturación y su sensibilidad a las reacciones de oxidación y también cuanto más insaturado sea el ácido, los puntos de fusión de los ácidos insaturados son menores que de los saturados para una misma longitud de la cadena de átomos de carbono.

Todos los ácidos grasos insaturados naturales presentan isomería cis. El isómero cis- posee los dos hidrógenos hacia el mismo lado, mientras que en el isómero trans- se encuentran alternados.



**Figura 3. Isomería Cis – Trans de los ácidos grasos.**

La presencia de dobles enlaces con isomería cis-, en los ácidos grasos insaturados hace que la cadena hidrocarbonada se doble en el espacio lo cual, a su vez, dificulta su empaquetamiento con otras moléculas próximas y asegura que los lípidos que contienen estos ácidos grasos tengan puntos de fusión bajos y, por consiguiente, sean fluidos a temperaturas fisiológicas, lo que facilita, entre otras cosas, su transporte en nuestro organismo. (Badui Dergal, 2006). Estructura tridimensional de dos ácidos grasos, la presencia de la insaturación

de configuración cis, torsiona la estructura espacial de la molécula, a diferencia de la estructura lineal del ácido graso saturado.

### 2.2.2.1 Ácidos Grasos Monoinsaturados

Los ácidos grasos monoinsaturados son ácidos grasos de cadena carbonada de número par que poseen una sola insaturación en su estructura, quiere decir que poseen un solo doble enlace carbono-carbono (-CH=CH-). Un ejemplo de este tipo de ácidos grasos monoinsaturados es el ácido oleico que se encuentra presente en la mayoría de grasas naturales, llamado comúnmente omega 9, los demás ácidos grasos monoinsaturados existen en cantidades promedio mucho menores. (Navas, 2010). El número que precede a la cantidad de carbonos, designa la cantidad de dobles enlaces insaturados y consecuentemente el valor es uno.

**Tabla 4. Ácidos grasos monoinsaturados más comunes encontrados en los alimentos**

	Número de Carbonos	Número de dobles enlaces	Nombre Común	Estructura	Fuente
	1	10	Caproleico	C10:1 n-1	Leche de rumiantes
<b>ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS</b>	1	16	Palmitoleico	C16:1 n-7	Nueces, aceite de pescado
	1	18	Oleico	C18:1 n-9	Aceites vegetales
	1	18	Vaccinico	C18:1 n-7	Grasas de rumiantes
	1	20	Gadoleico	C20:1 n-11	Aceites de pescado
	1	22	Cetoleico	C22:1 n-11	Aceites de pescado
	1	22	Erúcico	C22:1 n-9	Aceite de colza

Fuente: Mataix y Gil (2004)

### 2.2.2.2 Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI)

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's) tienen una estructura vital y roles funcionales en todos los seres vivos incluyendo a los humanos. Estos ácidos

confieren flexibilidad, fluidez y permeabilidad selectiva a las membranas, por consiguiente, tienen una gran importancia fisiológica y terapéutica para el bienestar del organismo humano. (Gong, Wan, Jiang, Hu y Huang, 2014)

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's), tienen en su estructura un grupo polar carboxilo que se encuentra unido a una cadena hidrocarbonada que se compone de 16 a 20 carbonos con dobles enlaces en dos o más pares de carbonos (C=C). Al ser "insaturados" son capaces de fijar más hidrógeno. (Navas, 2010)

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's) Figura 6 tienen en su estructura dos o más pares de átomos de carbono con dobles enlaces. Los AGPI's más importantes en esta clase son los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico, los cuales son esenciales porque no pueden ser sintetizados por organismo y por lo tanto, deben ser obtenidos a partir de la dieta. Los PUFAS componen un sustrato fácilmente oxidable, por lo cual presentan una mayor susceptibilidad al deterioro oxidativo a medida que aumenta el número de dobles enlaces en la cadena. (Ixtaina, 2010).



**Figura 4. Estructura del ácido graso poliinsaturado más importante en aceites vegetales (ácido linoleico)**

**Tabla 5. Relación de los principales ácidos grasos poliinsaturados (AGPI's) presentes en los aceites de pescado**

Nombre Común	Nombre Químico	Fórmula Global
Oleico	9-octodecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$
Linoleico	9,12-octodecadienoico	$C_{18}H_{34}O_2$
Linolenico	9,12,15-octadecatrienoico	$C_{18}H_{34}O_2$
EPA	5,8,11,14,17-eicosatetraenoico	$C_{20}H_{30}O_2$
Araquidónico	5,8,11,14-eicosatetraenoico	$C_{18}H_{32}O_2$
DHA	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	$C_{22}H_{32}O_2$
Clupanodónico	4,8,12,15,19- docosapentaenoico	$C_{22}H_{34}O_2$

### 2.2.3 Ácidos grasos Poliinsaturados Omega-3

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 resulta esencial para el hombre porque el organismo no puede sintetizarlos, por lo tanto, es necesario tener que obtenerlos a través de la dieta. (Piñeiro-Corrales, Lago Rivero, y Culebras-Fernández, 2013).

Hay dos familias de ácidos grasos esenciales que necesita el organismo: los omega-3 y los omega-6. Los AGPI's fundamentales para el cuerpo son el ácido araquidónico, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). (Valenzuela, Morales, Sanhueza, y Valenzuela, 2013)

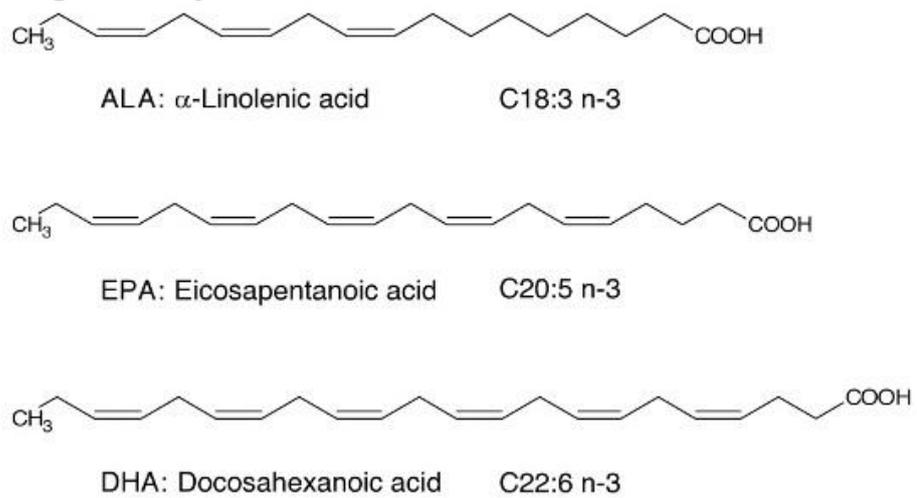
Los ácidos grasos del tipo omega-3 forman parte de la estructura de las neuronas, cerebro, retina y nervios periféricos. Son suplementarios y necesarios durante la etapa fetal por la madre a través de la placenta y al nacer por la leche materna. Ayudan a un buen desarrollo y crecimiento del tejido cerebral de los bebés, también a combatir el cáncer, para desarrollo de la vista y funciones del tejido celular, ayudan a regular la presión sanguínea, la viscosidad de la sangre,

combatir enfermedades cardiovasculares, trombosis, inflamaciones y artritis. (Roldán, 2016).

Los ácidos grasos omega 3 son tipos de grasa poliinsaturada esencial al igual que los ácidos grasos omega 6 son insaturados porque carecen de dos átomos de hidrogeno, poseen en lugar de ello dos átomos de carbono añadidos. Estos fueron descubiertos en 1982 por el investigador Ralph Holman. como resultado de un estudio sobre la dieta diaria de los esquimales. Estudios efectuados en Groenlandia resaltaron que la baja incidencia de infartos y enfermedades cardiovasculares entre los esquimales de la zona, estaba estrechamente relacionada a base de su dieta, que era muy rica en grasa animal marina ya que contiene una elevada cantidad de ácidos grasos de la clase omega 3. (Stoker y Walker, 1991)

Hay tres moléculas calificadas como omega 3: el EPA (ácido eicosapentaenoico) y el DHA (ácido docosahexaenoico). Estos se encuentran en los animales especialmente pescados, mientras que el ALA (ácido alfa linolénico) solo se encuentra en algunos vegetales (aceite de linaza, nueces, tofu). Estas tres sustancias tienen la misma estructura molecular, pero no son iguales; su estructura química se puede observar en la figura 5.

### Omega-3 fatty acids



**Figura 5. Estructura química de ácidos grasos de la familia omega -3**

Fuente: Kashiwagi y Huang (2012)

La fuente primaria de AGPI omega-3 es la gran diversidad de microorganismos e invertebrados que forman el fito y zooplancton marino, estos pueden elongar y desaturar el ALN transformándolo a través de una sucesión de pasos intermediarios en EPA y posteriormente en DHA, que se transfieren vía cadena alimenticia a peces, crustáceos y mamíferos. Mientras mayor es el contenido de grasa de estos animales, mayor es el contenido de EPA Y DHA de su carne y del aceite que se obtiene de muchos de ellos. El EPA se almacena principalmente en el tejido adiposo, mientras que el 90% o más del DHA constituye el tejido nervioso y cerebro de estos animales, principalmente en la forma de fosfatidil serina y fosfatidil etanolamina. De esta forma, los peces llegan a constituir importantes fuentes de EPA y DHA, ya sea consumidos como tal o a través de los productos de su industrialización (principalmente, harina y aceite). (Robalino, 2009)

### **2.2.3.1 Ácido Eicosapentaenoico (EPA)**

Es parte de la familia de ácidos grasos omega-3 y se origina de la prostaglandina, la cual controla la circulación de la sangre al igual que también otras funciones arteriales. Por otro lado, ayuda a reducir el colesterol de baja densidad y ayuda a aumentar los niveles de colesterol de alta densidad. Por otro lado, la prostaglandina es completamente responsable de la producción de plaquetas en la sangre, las cuales actúan como “parches” que ayudan a reforzar las arterias y venas que permiten la buena circulación de la sangre, particularmente en los pequeños capilares del corazón, combate la trombosis y enfermedades del sistema circulatorio. (Roldán, 2016)

### **2.2.3.2 Ácido Docosahexaenoico (DHA)**

La relevancia del ácido docosahexaenoico radica porque es componente principal de los tejidos cerebrales del hombre y de la retina de los ojos, además ayuda en la transmisión de impulsos nerviosos al sistema nervioso central. Las investigaciones hechas sobre el uso de ácidos grasos de tipo omega en la dieta humana, indican que el consumo de algún ácido graso omega en especial no es suficiente para mostrar efectos positivos a la salud, al parecer ello se lograría por la proporción o relación que presentan los contenidos de ácidos grasos omega-6 respecto a los omega-3, en los alimentos. (Valenzuela, Morales, Sanhueza y Valenzuela, 2013)

## **2.3 Definición de Aceite de pescado semi-refinado**

La denominación de aceite semi-refinado consiste cuando el aceite ha sido tratado con una solución de sosa caustica para la eliminación de ácidos grasos libres, la cual esta reacción da como resultado la formación de jabones sódicos y favorece a la coagulación

de las sustancias mucilaginosas presentes. La semi-refinación de aceite de pescado se basa en una reacción química, las industrias aceiteras comienzan este procedimiento bombeando aceite hacia el interior de un reactor seguidamente de la adición de una solución alcalina en exceso, agitando inmediatamente la mezcla, para procurar un intrínseco contacto entre el aceite y la fase acuosa, luego la mezcla se deja en reposo durante 2-3 horas al término de este tiempo se decanta la parte de los jabones sódicos formados en la reacción y en la parte superior precipita el aceite, luego se procede a lavar con agua caliente para eliminar posibles residuos de jabones sódicos. Después del proceso el aceite semi.refinado pasa por un proceso de blanqueo que se realiza con el objetivo de reducir las materias colorantes y pigmentos naturales del aceite, también así para eliminar mucílagos en suspensión no eliminados en el proceso anterior, para este proceso de blanqueo se utilizan arcillas naturales y arcillas activadas. Para determinar la calidad final del aceite semi-refinado se evalúan parámetros básicos como: Ácidos grasos libres, Índice de saponificación, jabones, humedad y materia volátil, Impurezas insolubles, índice de peróxido, anisidina, índice de yodo y color. Obtenido el aceite semi-refinado se puede continuar su uso en el enriquecimiento de alimentos o preparación de los mismos. (Robalino, 2009)

### **2.3.1 Características de Aceite de pescado semi-refinado**

Es importante el conocimiento sobre la caracterización de los aceites de pescado semi-refinados ya que puede determinar los usos y precio en el mercado.

Conforme a las normas de calidad que menciona la NTP 312.009:1985 (Revisada el 2010) estas características se indican en la Tabla 6.

**Tabla 6. Especificaciones industriales de calidad para el aceite de anchoveta semi-refinado**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Acidez libre expresada como ácido oleico	Máx. 0.50%
Contenido de Humedad	Máx. 0.20%
Contenido de impurezas insolubles	Máx. 0.10%
Contenido de materia insaponificable	Máx. 1.50%
Índice de Yodo (Wijs)	175-198
Índice de saponificación	186-198
Densidad a 25 °C	0.92-0.93
Color Gardner	Máx. 9

Fuente: NTP 312.003:1970 (Revisada el 2010)

En el Perú existen especificaciones a nivel industrial para diversos productos entre ellos el aceite semi-refinado, las cuales son importantes analizar porque rigen las operaciones del proceso. Una de ellas es el % de ácidos grasos, índice de yodo y color.

#### **2.4 Proceso de Semi-refinación de aceite crudo de pescado**

La comercialización de aceite crudo de pescado es bajo debido a la poca aceptabilidad como alimento rico en grasa, por sus características que son el color, aroma y gusto que le confieren al aceite y que por lo tanto reduce su vida útil.

Los factores que afectan la calidad de un aceite crudo de pescado se encuentran principalmente desde el momento de la extracción de la materia prima, el proceso y su almacenamiento. (Boran, Karacam y Boran, 2006)

Para poder tener un aceite de calidad que pueda ser consumido por el ser humano de forma directa e indirecta es necesario eliminar componentes no deseables que afectarían

su calidad estos componentes son: fosfátidos (lecitinas), pigmentos colorantes, ácidos grasos, peróxidos, jabón, impurezas como gomas, por lo tanto, es necesario procesos que traten de eliminar este tipo de impurezas en el aceite crudo. (Ghazani y Marangoni, 2013)

El refinamiento de grasas se da con el fin de eliminar o reducir las sustancias extrañas que pueden perjudicar en el sabor (acidez), color y olor del aceite crudo. (Boran, Karacam y Boran, 2006)

Los componentes que reducen la calidad de un aceite crudo aparecen por diversos factores comenzando desde el estado de conservación de la materia prima ya que en este punto se propicia la fermentación de sus componentes, el método de extracción utilizado y el grado de agotamiento alcanzado en el mismo. (Ghazani y Marangoni, 2013).

El proceso de semi-refinado es una secuencia de etapas que tienen un propósito que llega a eliminar o reducir cada componente del aceite que sea capaz de disminuir su calidad.

**Tabla 7. Etapas del proceso de semi-refinado**

<b>ETAPA</b>	<b>PROPÓSITO</b>
<b>DESGOMADO</b>	Modificación de fosfolípidos, traza de metales. Pigmentos, proteínas, para la extracción en fase acuosa.
<b>NEUTRALIZACIÓN</b>	La reducción o eliminación de los ácidos grasos, fosfolípidos, trazas de metales. Pigmentos, azufre, compuestos insolubles de aceite. Solubles en agua.
<b>LAVADO</b>	Eliminación de jabón
<b>SECADO</b>	Evaporación de agua
<b>BLANQUEO</b>	Reducción de pigmentos. Productos de oxidación, trazas de metales. Azufre: la eliminación de restos de jabón.
<b>FILTRADO</b>	La eliminación de tierra de blanqueo gastado.

Fuente: Campos (2017)

### 2.4.1 Desgomado

En esta fase, que también es llamada depuración o desmucilaginación tiene como objetivo principal eliminar los fosfolípidos que también son llamados fosfátidos o gomas, los procesos tradicionales tienen altas pérdidas de aceite. La eliminación de estos componentes es importante ya que son altamente emulsionantes. (Gupta, 2017)

Las gomas normalmente están asociadas a metales prooxidantes principalmente hierro que disminuyen la estabilidad del producto y le atribuyen turbidez por aparición de precipitados, si no se realiza el desgomado durante el proceso de desodorización (refinado) el aceite tendrá un color más oscuro y no tendrá un buen carácter organoléptico y estabilidad., también los fosfolípidos impiden la correcta formación de cristales y separación de fases durante la fase de winterización.

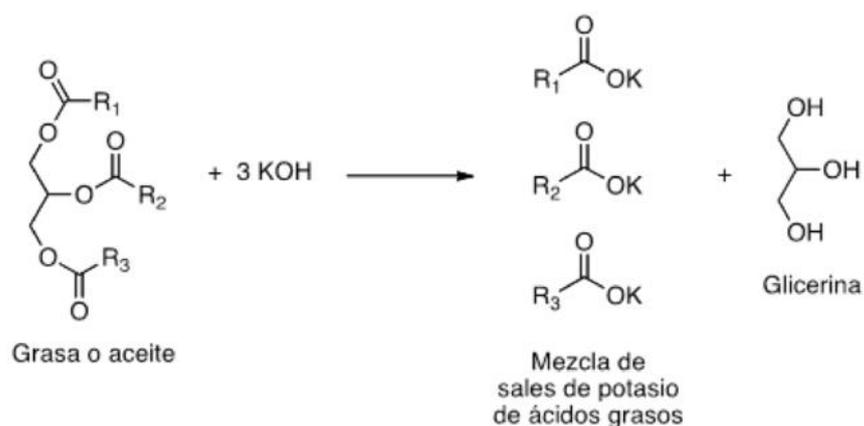
Este proceso de desgomado se realiza adicionado ácido fosfórico a bajas temperaturas, el ácido tiene el efecto de precipitar y carbonizar las proteínas, pigmentos colorantes, etc. Se necesita en esta etapa tener una buena agitación para evitar otras reacciones desfavorables. (Roldán, 2016)

Procedimiento más utilizado a nivel local utiliza un tanque con agitación mecánica y sistemas de vapor. El aceite crudo es calentado hasta aproximadamente 80 °C y se mezcla con solución de ácido cítrico o fosfórico (0.1% - 0.3%) con una pureza del 85%. Las gomas llegan a ser hidratadas (flóculos) y apartadas del aceite. Relación 5:1, aceite: solución, a la misma temperatura. Agitación durante 10 a 15 minutos Durante el proceso ocurre la siguiente reacción: Fosfátidos + Ácido Fosfórico Esteres de ácido Fosfórico + Ácido Graso. (Etienne Deffense, 2020)

## 2.4.2 Neutralizado

Luego de la extracción del aceite crudo de pescado hasta su procesamiento (semi-refinado) sufre un cambio importante llamado hidrólisis de su componente principal que son los triglicéridos estos se descomponen en glicerina y ácidos grasos libres estos últimos son los que aumentan la acidez en el aceite y las mermas durante el semi-refinado. (Roldán, 2016)

El objetivo de este proceso es para eliminar los ácidos grasos libres del aceite, por lo cual reduce la acidez hasta límites aceptables (0.05% AGL). Se utiliza para este proceso una base la más común en la industria es la soda caustica ya que su uso tiene bajo costo operativo y fácil preparación. La función de este álcali es que neutraliza y decolora mediante la reacción que se da:



**Figura 6. Reacción química de neutralización de ácidos grasos**

Fuente: Regla, Vázquez Vélez, Cuervo Amaya, y Cristobal (2014)

La concentración de soda cáustica usada para neutralizar es usualmente fuerte debido a que los ácidos grasos libres son mayores que 1.5% y también debido al efecto o acción de disolución de la soda concentrada en los pigmentos del aceite. Es frecuente encontrar que las unidades de la concentración de soda para neutralizar aceites estén dadas en: densidad (d), grados Baumé (°Be), Normalidad

(N) o porcentaje en solución (%). Es común utilizar una de las series de concentraciones entre 12° y 20°Be clasificadas de dos en dos grados. Es recomendado emplear concentraciones de 12° o 14°Be para aceites de baja acidez.

Las características de un aceite neutro típico, debe tener las siguientes características: Acidez libre: 0.1%,  $\varpi$  Jabón: < 50 ppm,  $\varpi$  Humedad: < 0,1%, Impurezas: ausencia. (Group Camar Peru SAC, 2019)

### **2.4.3 Lavado y secado:**

Pasado el proceso de neutralización del aceite es necesario un lavado con agua caliente a una temperatura de hasta 100 °C por medio de duchas (sistema de regaderas) con un corto periodo de agitación para la homogenización, esto ayuda a eliminar los restos de jabón residual precipitándolos después de un tiempo de reposo. Para el lavado es frecuente utilizar una proporción 5:1 de aceite:agua, terminado el lavado se detiene la agitación y el agua de lavado se retira por decantación. (Roldán, 2016)

Utilizar presión de vacío en el lavado minimiza la interacción del aceite y el aire que resulta en bajos índices de peróxidos, valores de anisidina y color del aceite decolorado. (Brooks, Berbesi y Hodgson, 2013)

En la etapa de secado tiene objetivo eliminar la humedad contenida en el aceite después de los lavados (0.5 % aprox.) se realiza calentando el aceite hasta 95- 100 °C en atmósfera de vacío. Una prueba práctica de humedad en el aceite es la presencia de espuma en la capa superior, la cual debe desaparecer cuando el aceite este seco. (Colpex, 2019)

#### 2.4.4 Blanqueado o decoloración

Las condiciones que afectan frecuentemente el color del aceite son la elevada temperatura durante el proceso de obtención de aceite, la alta temperatura logra la oxidación de diferentes compuestos como por ejemplo el  $\alpha$ -tocoferol que al oxidarse origina el cromano-5,6-quinona de color pardo rojizo, por ello la finalidad principal de esta fase es eliminar los pigmentos naturales solubles que se encuentran presentes en el aceite como carotenos, xantofilas, clorofilas entre otras no definidas y que son atribuidas al proceso inadecuado, oxidación del aceite y almacenamiento. Las coloraciones que podemos encontrar comúnmente son amarillo, anaranjado o verdusco característico. (Bailey, 1961)

El blanqueamiento se realiza de muchas formas, pero la técnica más típica en la industria es la decoloración por adsorción, en la que materiales con alta actividad superficial, tales como tierras blanqueantes o carbón activado, retienen las sustancias colorantes por adsorción; otro ejemplo de blanqueo, es mediante calor y es el más adecuado y efectivo en carotenoides para lo cual se usa en gran escala en combinación con el blanqueo por adsorción y el proceso de desodorización. (González-Tovar, Noriega-Rodríguez, Ortega-García, Gámez-Meza y Medina-Juárez, 2005)

Este blanqueado por adsorción se realiza en tanques con agitación y sistema de secado, con frecuencia es el mismo tanque donde se realiza un lavado. Se utilizan tierras o arcillas adsorbentes naturales o activadas, tierras activadas: 100 a 121° C  
Tierras naturales: 90 a 99° C. (Roldán, 2016)

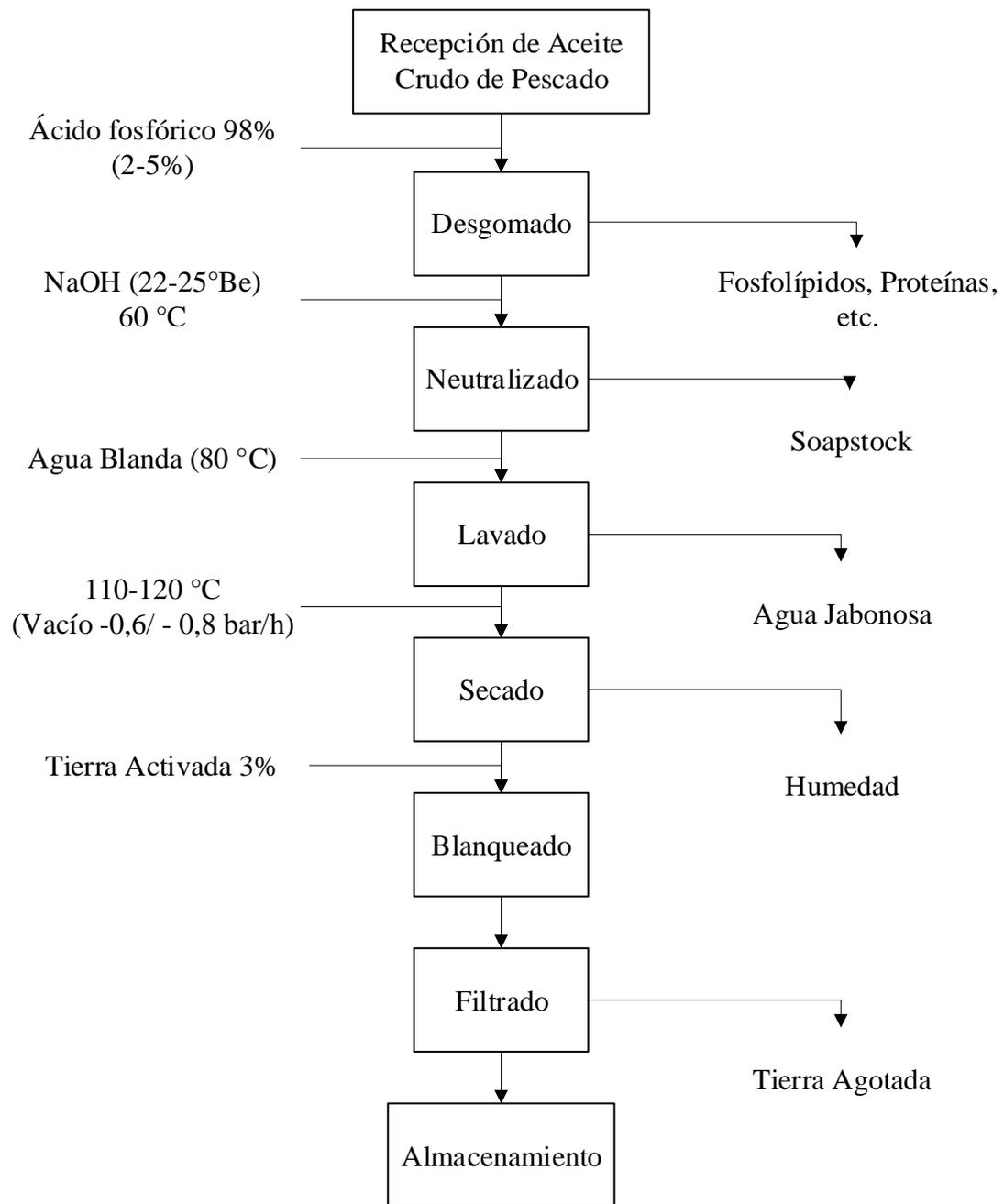
En algunos procesos de refinación, sólo el 20% del color relacionado carotenoide es eliminado durante el blanqueo. (Silva, Sampaio, Ceriani, Verhé, Stevens, Greyt,

y Meirelles, 2014). El blanqueo es una de las etapas de este proceso que más genera cambios al aceite, aquí ocurre la disminución de tocoferoles y esteroides de manera significativas, debido a que son más sensibles a la luz, temperatura, alcalí y metales. (Torres González, Angulo Guerrero, Oliart Ros, & Medina Juárez, 2009). Asimismo, durante la neutralización se puede llegar a reducir el valor total de oxidación, el cual se calcula  $VT = 2V.P. + V.A$ , donde V.P. es el valor de índice de peróxidos y V.A. es el valor de índice de anisidina, debido a la adición de la tierra activada, sin embargo, se debe mantener la agitación para así evitar la oxidación del aceite, el cual ocurre cuando la tierra deja de estar en suspensión (Roldán, 2016)

Plantas de procesamiento de semi-continuas son los preferidos para este tratamiento. La filtración eficaz para la eliminación de la arcilla es esencial porque las impurezas se adhieren a las partículas de arcilla que quedan en el aceite como catalizadores de autooxidación. La arcilla activada, fabricado por tratamiento ácido de arcilla natural, es más eficaz en el blanqueo. La arcilla activada puede causar un aumento del contenido en ácidos grasos libres del aceite decolorado. (Bonilla-Méndez y Hoyos-Concha, 2018)



**Figura 7. Proceso de cambio de color en el decolorado o blanqueado**



**Figura 8. Proceso de Semi-refinado de aceite crudo de pescado**

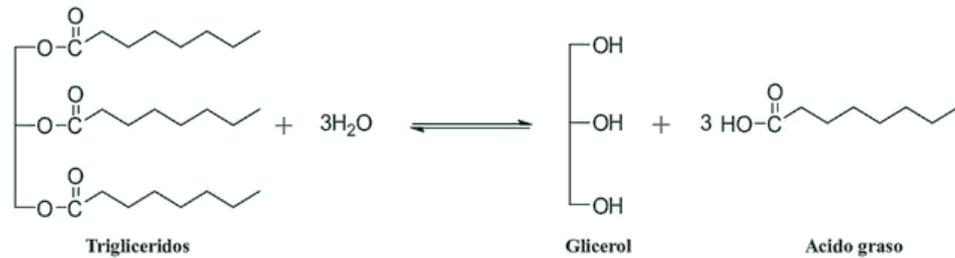
Fuente: Colpex (2019)

## **2.5 Enzimas Lipídicas**

Las enzimas catalizan reacciones químicas, que sea termodinámicamente posible. Estas son de naturaleza proteica por lo cual se les denomina biocatalizadores. La mayoría de procesos químicos celulares utilizan enzimas o biocatalizadores. Como cualquier enzima, las lipídicas funcionan disminuyendo la energía de activación para una reacción, acelerándose substancialmente la velocidad de la reacción. Las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas, siendo su actividad afectada por agentes ambientales como: temperatura, pH, presión y/o agentes operacionales como la aireación. Por otro lado, la presencia de inhibidores que disminuyen la actividad enzimática, obliga a trabajar habitualmente a concentraciones de sustratos y productos bajos, lo que muchas veces provoca un encarecimiento de la etapa de purificación del producto de interés. Esto, asociado a su elevado costo y su poca estabilidad en medios y condiciones alejadas de las fisiológicamente habituales, lleva a continuos estudios para la optimización de procesos biocatalíticos. (Robinson, 2015)

### **2.5.1 Características generales de las enzimas lipolíticas**

Una de las aplicaciones más comunes de la biotecnología es la producción y utilización de enzimas. Entre estas enzimas se encuentran las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas EC. 3.1.1.3), que pertenecen a un grupo de enzimas hidrolíticas, cuya función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o sus productos intermedios como monoglicéridos y diglicéridos.



**Figura 9. Hidrólisis de un triglicérido (R representa los ácidos grasos saturados o insaturados)**

Fuente: Torres-Sáez (2014)

En el medio, las lipasas actúan en la interfase orgánico-acuosa y su modelo cinético normalmente no se ajusta a las clásicas reacciones del tipo Michaelis-Menten, que, por su definición, solo es válido para reacciones en fase homogénea. De hecho, las reacciones lipolíticas se producen en la interfase lípido-agua en la que los sustratos lipolíticos por lo general forman un equilibrio entre los estados monomérico, micelar y emulsionado. (Lascano Demera, 2018)

### 2.5.2 Actividad Lipídica

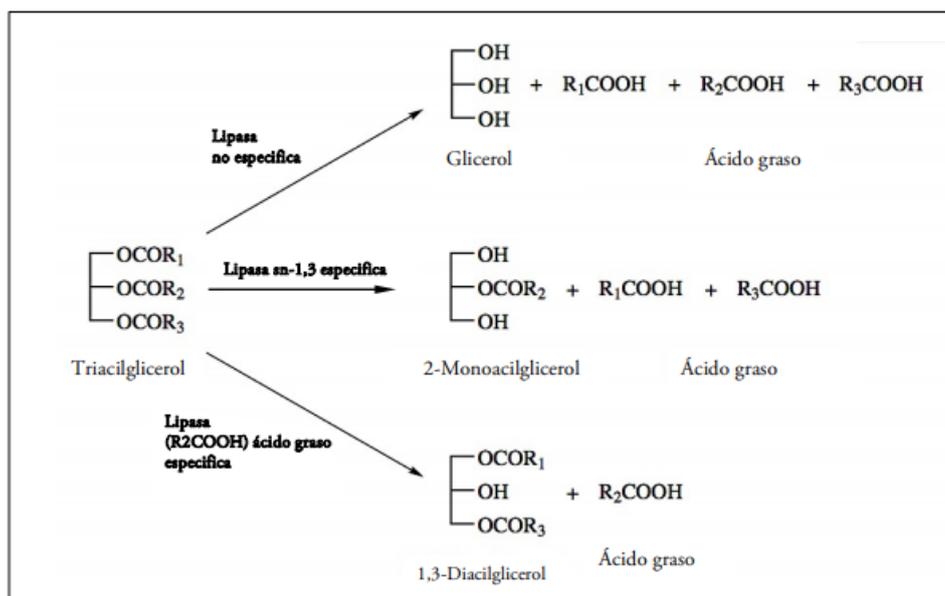
La actividad enzimática independientemente de la especificidad del sustrato, puede ser medida determinando la velocidad de aparición de un producto o desaparición de un sustrato; en la actualidad existen diversos métodos para establecer cualitativa o cuantitativamente la capacidad hidrolítica de las lipasas y que dependerá de factores como costo, equipos, reactivos y nivel de sensibilidad. (Cachago, 2015)

### 2.5.3 Especificidad enzimática

La especificidad es una de las propiedades más notables de la molécula de la enzima y se puede definir como una diferencia comparativa de los tipos de catálisis de ciertas reacciones (Bailey, 2005) y que pueden presentarse con

relación a su actividad, propiedades a nivel molecular, y estructura del sustrato. (Cachago, 2015). Las lipasas se pueden clasificar en tres grupos basados en su especificidad; al azar (no-regio específica), sn-1,3-específica (regio específica) hacia los TG's, y específica para un ácido graso determinado o una clase de ácido graso, como se observa en la figura 10; estas especificidades no se logran en las reacciones de hidrólisis, esterificación, o interesterificación catalizada químicamente.

- Lipasas no específicas: su uso conduce a la completa ruptura de TG a glicerol y ácidos grasos libres.
- Posicional o regioespecificidad: estas lipasas tienen la capacidad de dividir ácidos grasos en las posiciones sn 1-3 del TG e hidrolizan para proporcionar ácidos grasos libres, 1,2 o (2,3) di glicéridos y 2-monoglicéridos.
- Lipasas con respecto al ácido graso: son selectivas respecto a una clase de ácidos grasos independientemente de su posición en la cadena principal de glicerol, realizando una acomodación de la cadena carbonada del ácido graso en el centro activo de la enzima e hidrolizando con mayor velocidad. (Gutierrez, 2000)



**Figura 10. Regiospecificidad de las lipasas.**

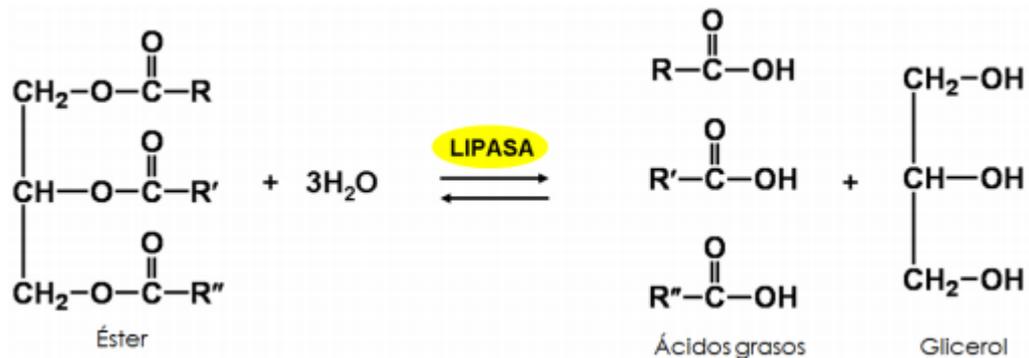
Fuente: Bailey (2005)

## 2.6 Concentración de Ácidos Grasos Poliinsaturados por hidrólisis enzimática

### 2.6.1 Reacción de hidrólisis enzimática

Los procesos tradicionalmente empleados para la producción de ácidos grasos son los químicos y enzimáticos; los procesos químicos se desarrollan bajo condiciones de temperaturas y presiones elevadas con diferentes tiempos de reacción obteniendo productos muy variados en naturaleza y pureza (Salimon, Mudhaffar Abdullah y Salih, 2011), por ejemplo en la hidrólisis alcalina, empleado condiciones de reacción suaves (70-100 °C), el producto adquiere olor y color no deseado; mientras en procesos continuos utilizando una elevada presión (5000 kPa) y temperatura entre 250-360 °C, puede conllevar a una posible desnaturalización de ácidos grasos (Goswani, De, y Basu, 2012); en comparación con la hidrólisis catalizada por lipasa, esta posee claras ventajas con una excelente pureza del producto y condiciones de proceso leve.

Las enzimas se consideran catalizadores naturales. Las lipasas son triacilglicerol hidrolasas. Todas ellas comparten un mismo sitio activo (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly). Actúan en enlaces éster carboxílicos catalizando la hidrólisis de ésteres formados por glicerol y ácidos grasos de cadena larga (Figura 11). También catalizan reacciones de esterificación, interesterificación, acidolisis, alcoholisis y aminolisis. Son enzimas que muestran buena quimioselectividad, regioselectividad y enantioselectividad. Se trata de enzimas muy versátiles cuyo uso se ha incrementado notablemente en los últimos años.



**Figura 11. Acción catalítica de las lipasas. Un triglicérido puede hidrolizarse en glicerol y ácidos grasos.**

Fuente: Rivas (2015)

La lipasa de *candida rugosa*, *candida cylindracea* (CCL), *mucor javanicus* y *aspergillus niger* pueden usarse para concentrar los PUFA n-3, como lo describen en diversas investigaciones. (Kahveci y Xu, 2011).

Esto se debe a que su lipasa hidroliza el EPA y el DHA a una tasa menor en comparación con los ácidos grasos de cadena relativamente lineal. Finalmente, el concentrado de PUFA n-3 (principalmente como acilglicéridos) de la hidrólisis catalizada por lipasa se puede usar en diversas industrias alimentarias sin procesos químicos o enzimáticos adicionales. Por lo tanto, esta técnica reduce el uso de productos químicos y solventes.

La preferencia de la lipasa por los componentes de ácidos grasos es de orden decreciente: ácido palmitoleico >ácido oleico>= ácido palmítico >ácido esteárico>EPA >DHA. (Hosseini, Ghorbani, Madhi Jafari, & Sadeghi Alireza, 2018)

### 2.6.2 Factores que afectan las reacciones catalizadas por lipasa

Las variables en el proceso de hidrólisis tales como la concentración de agua, temperatura de reacción, el pH, tipo disolvente y sistemas de inmovilización, tienen una marcada influencia en el rendimiento de la reacción con efectos significativos respecto la actividad enzimática. (Goswani, et *al.*, 2012)

- **Contenido de agua:** El agua desempeña diferentes funciones en las reacciones catalizadas por enzimas. Se requiere un cierto nivel de agua en el medio de reacción para mantener una capa de agua alrededor de la molécula de enzima y mantener su actividad (estado conformacional tridimensional activo). El agua también contribuye a la integridad estructural, la polaridad sitio activo, y la estabilidad de la proteína. (Bailey, 2005)
- **Temperatura:** Un aumento de la temperatura puede generar también un incremento en la velocidad de reacción, sin embargo, cuando esta sobrepasa un cierto valor, puede alterar la conformación molecular de la lipasa y la estabilidad de su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria (Goswani, et *al.*, 2012); por ende, el aumento de su actividad se verá comprometida por el efecto de la desnaturalización térmica a elevadas temperaturas impidiendo su acción catalítica.
- **Efecto de pH:** Generalmente cada enzima es catalíticamente activo sólo en un rango de pH, las variaciones extremas de pH pueden afectar su estructura

y por lo tanto cambiar su conformación y actividad, sin embargo. En este estudio situaciones extremas de pH no se aplican, ya que escala industrial sus condiciones de pH son controladas alrededor de 6.5-6.8 que son valores tomados del agua que se añadirá para el proceso de hidrólisis. Se ha demostrado que el empleo de diferentes disolventes orgánicos debido a su polaridad, afecta también a las reacciones catalizadas por lipasa; a pesar de estos antecedentes existe razones por el cual no se toma en cuenta en este estudio:

1. Al tratarse de un proceso que estará destinado a la elaboración de producto de consumo humano.
2. La ausencia de disolvente facilita el procesamiento de aguas y ahorro de costes significativos en la eliminación del disolvente.

### **2.6.3 Hibernación de aceite hidrolizado**

Muchos estudios proponen que luego de la hidrólisis enzimática del aceite de pescado se apliquen otros procesos adicionales para lograr la concentración de AGPI omega -3 como fraccionamiento por fluidos supercríticos (FFSC), fraccionamiento por cromatografía, formación de complejos con úrea, filtración por membranas e hibernación de aceite (Magallanes, Tarditto, Grosso, Pramparo y María, 2019). En esta investigación la hibernación es uno de los métodos más adecuados a ser aplicado para lograr concentrados de AGPI omega-3, dado a que este proceso involucra la cristalización parcial del aceite (componentes saturados) logrando un enfriamiento controlado, seguido de una filtración. El objetivo principal es la separación de los ácidos grasos saturados liberados durante la hidrólisis, esta separación se logra por la diferencia del punto de fusión de los diversos ácidos grasos, este punto de fusión se encuentra

en función principalmente de la longitud de la cadena y el grado de insaturaciones que posean los ácidos grasos. (Bonilla-Méndez y Hoyos-Concha, 2018).

## **2.7 Parámetros de calidad**

“Existe un gran número de análisis para evaluar las características físicas y químicas de las grasas; los resultados ofrecen información sobre la naturaleza, el origen y el posible comportamiento de las grasas en diferentes condiciones de almacenamiento y procesamiento”. (Bailey, 2005)

### **2.7.1 Humedad**

Es un parámetro que puede indicar la limpieza de equipos y tanques en los que el aceite se almacena y/o transporta, estos deben estar limpios y secos antes de uso. La presencia de agua facilita la descomposición de las grasas en ácidos grasos generalmente a temperaturas elevadas, esta hidrólisis también es promovida por la acción de determinados microorganismos (AOCS, 2009)

### **2.7.2 Punto de fusión**

Es la temperatura en que la fase sólida cambia a la líquida (Badui Dergal, 2006), el punto de fusión en los ácidos grasos aumenta con la longitud de la cadena y disminuyen con el aumento de insaturaciones, esta disminución se debe al doblamiento de la cadena en el doble enlace ya que no se pueden empaquetar juntas en un estado sólido (Wade, 2004).

### **2.7.3 Índice de peróxido**

Indica la cantidad de oxígeno de la grasa unido en forma de peróxido, el índice de peróxido muestra el estado de oxidación de la grasa o aceite permitiendo establecer el estado de descomposición. Se define como los miliequivalentes de

peróxido por kilogramo de grasa (mEq/kg) (Nielsen, 2009) cuantificado con reacciones de coloración.

#### **2.7.4 El índice de acidez**

Es un parámetro que establece el contenido de ácidos libres presentes en las grasas y aceites, en cuestión de la calidad permite medir la posible alteración debido a lipasas por efecto de la luz y el calor. (AOCS, 2009)

#### **2.7.5 Índice de saponificación**

Es un parámetro que establece la cantidad de ácidos grasos libres y ligados contenidos en una grasa y transformados a jabones por saponificación (figura 18); esto es medido por la cantidad de KOH empleados para la hidrólisis de grasa. El índice de saponificación está relacionado inversamente proporcional a la longitud de los ácidos grasos constituyentes de los glicéridos de la grasa. El método es aplicable solo a aceites y grasas que tengan un contenido de ceras no superior al 5%. (Serpa, Echeverri, Lezcano, Vélez, Ríos y Hincapié, 2014)

El índice de saponificación es inversamente proporcional al peso molecular promedio de los ácidos grasos.

En química, se define el índice de saponificación de una grasa, como el número que indica la cantidad en miligramos de hidróxido de potasio, necesaria para saponificar por completo un gramo de esa grasa. (Al-Hamamre, Foerster, Hartmann, Kröger y Kaltschmitt, 2012)

#### **2.7.6 Cromatografía de gases**

La cromatografía en general es un método físico analítico, cuyo objetivo es separar distintos componentes presentes en una mezcla compleja permitiendo caracterizarlos. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se

desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o una superficie sólida. (Czaplicki, 2013)

Los diferentes tipos de cromatografía se clasifican por el tipo de fase móvil:

- Cromatografía de Líquidos (LC)
- Cromatografía de Gases (CG)
- Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SLC)

En la CG, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte. A diferencia de otros tipos de cromatografía la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito. (Skoog, 2001)

En el análisis de grasas y aceites la CG consiste en la introducción al puerto de inyección de ésteres metílicos, que se vaporizan y transportan por un gas inerte a través de la columna con el líquido de reparto que presenta solubilidad selectiva con los componentes de la muestra ocasionando su separación.

Los componentes que fluyen de la columna pasan uno a uno por el detector, el cual genera una señal eléctrica proporcional, la que es transformada por el integrador en una gráfica de la señal obtenida contra tiempo llamada cromatograma. (Norma Mexicana NMX-F-017-SCFI, 2011).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

A continuación, se describe el lugar de ejecución, materiales y metodología para la realización del presente trabajo de investigación.

#### **3.1 Lugar de Ejecución**

Para lograr la ejecución del presente trabajo de investigación se utilizaron las siguientes instalaciones de la Universidad Nacional del Santa:

- Laboratorio de Química Orgánica de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.
- Instituto de Investigación Tecnológica Agroindustrial

También para la realización de análisis especializados como determinación de ácidos grasos se prestaron los siguientes laboratorios:

- Laboratorio de análisis fisicoquímico de la empresa ABBSER SAC; Áncash, Chimbote.
- Laboratorio de análisis fisicoquímico de la empresa Group Camar Perú SAC; Áncash, Chimbote.

#### **3.2 Materiales, equipos e instrumentos**

##### **a. Materia prima**

El aceite de pescado semi-refinado de anchoveta fue proporcionado por la empresa COLPEX en el mes de febrero del año 2020.

## **b. Enzima**

La lipasa comercial AY “Amano” 30 SD fue adquirida de la empresa AMANO ENZYME, enzima aislada de la *candida cylindracea*.

### **Especificaciones:**

Actividad lipídica : 30 000 u/g

pH : 3.0 – 8.0

Temperatura (°C) : 40 - 50

## **c. Reactivos**

- Etanol (96%)
- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Fenolftaleína
- Solución Hanus
- Yoduro de Potasio (KI)
- Cloroformo (CH<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>)
- Almidón
- Tiosulfato de Sodio
- Hexano
- Ácido Acético Glacial (CH<sub>3</sub>COOH)
- p-anisidina (CH<sub>3</sub>O.C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.NH<sub>2</sub>)
- Trifloruro de boro
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH)
- Cloruro de Sodio
- Isooctano (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>)

- Nitrógeno (gas)

**d. Instrumentos**

- Bureta de 10 mL
- Pipeta de 10 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL.
- Vaso de precipitación de 300mL.
- Estufa.
- Bureta de 25 mL.
- Pipeta volumétrica de 10 mL y 25 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapa esmerilada.
- Probeta de 100 mL
- Espectrofotómetro y celdas de cuarzo
- Celdas de cuarzo de 1 cm de espesor.
- Balanza analítica con 0.0001 g de precisión.
- Fiolas de 25 mL.
- Pipetas de 1 mL y 5 mL.
- Tubos de ensayo
- Baño María de Temperatura constante
- Fuente de nitrógeno seco, con válvula reguladora.
- Campana extractora.
- Tubos de vidrio con tapa rosca.
- Viales de 2 mL, y septas.
- Pipetas Pasteur

#### e. Equipos

- Agitador de Tubos: Barnstead Thermolyne M37615
- Agitador Magnético: Thermolyne Nuova II Stirrer S18520-26  
(estadounidense)
- Balanza Analítica: Prease Gravimetrics AG 221LX
- Balanza Digital: Precisa XB-320M
- Baño María: LAUDA ALPHA A 12 (alemana)
- Minirreactor: vaso de 500 mL
- Centrífuga: P-selecta 209
- Centrífuga: Sigma Sartorius 2-16PK
- Espectrofotómetro UV/VISIBLE: GENESYS 10S VS Thermo Scientific  
(estadounidense)
- Estufa Eléctrica: P-selecta 209
- pH metro: Orion Star A211 Thermo Scientific (estadounidense)
- Refrigerador
- Cromatógrafo de Gases: TRACE 1300 GC- Thermo Scientific  
(estadounidense)
  - Detector de Ionización de Flama (FID).
  - Sistema de inyección para columna capilar Split.
  - Horno de columna.
  - Columna para cromatografía: Sílica fundida, 100 m x 0.25 mm id (o 0.32 mm), recubierta de una película de fase líquida de Polietilenglicol, en base de Carbowax 20M.

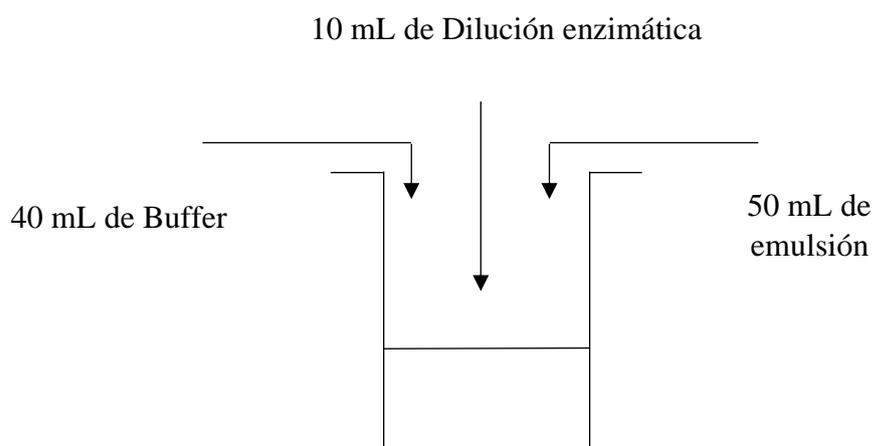
### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Determinación de la actividad lipídica

La actividad lipídica de la enzima AY AMANO 30 SD, se determinó siguiendo el método de ensayo para lipasas a pH 7.0, empleado por el proveedor AMANO ENZYME (2019), usando como sustrato emulsión de aceite de oliva con una solución al 2% de un polímero sintético soluble en agua.

El método para medir la formación de productos (ácidos grasos libres) en la hidrólisis, se realizó titrimétricamente, usando el método descrito por Camacho T. (2014), titulando con una de base de Hidróxido de sodio (NaOH 0.05N) para determinar el grado de acidez en el aceite.

Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 umol de ácidos grasos libres por minuto. A continuación, se presenta el esquema de trabajo empleado:



**Figura 12. Esquema de trabajo en minireactor**

Antes de la hidrólisis enzimática se prepararon las siguientes condiciones:

### **A. Preparación de Solución PVA al 2%**

Para la preparación del sustrato fue necesario antes preparar una solución de alcohol polivinílico 100% hidrolizado al 2% de concentración.

- Se pesó 5 g de alcohol polivinílico completamente hidrolizado y se disolvió en 200 mL de agua caliente (70 – 80°C).
- Luego se dejó enfriar a 25 °C y se aforó a 250 mL.
- Finalmente se filtró con algodón para obtener la solución PVA al 2%.

### **B. Preparación de la emulsión (sustrato)**

Para la preparación de la emulsión se utilizó como sustrato el aceite de oliva extra virgen comercial.

- Se licuó 225 mL de la solución PVA al 2% y 75 mL de aceite de oliva extra virgen.
- Se licuó esta emulsión durante 3 minutos y 20 segundos y se dejó reposar el mismo tiempo, esto se repitió tres tiempos.
- Se dejó enfriar a 10 °C y reposó durante 1 hora.
- La emulsión estuvo lista para usar al momento que no se separe en dos fases, debe ser totalmente homogénea.

### **C. Preparación de la enzima**

Para hallar la actividad enzimática se trabajó con tres diluciones 1:6000, 1:7000 y 1:8000.

- Se disolvió 1 g de enzima en 100 mL de agua destilada
- Se tomó 1 mL de solución y se diluyó en 59, 69 y 79 mL respectivamente.

#### **D. Preparación de tampón citrato fosfato**

- Se pesó 0.40258 g de ácido cítrico y se diluyó en 100 mL.
- Se pesó 0.89625 g de fosfato de sodio dibásico y se diluyó en 100 mL.
- Para preparar el tampón a pH 7.0 se utilizó 6.50 mL de solución de ácido cítrico y 43.50 mL de solución de fosfato de sodio dibásico y se diluyó en 100 mL.
- Para regular el pH del tampón se utilizó ácido ortofosfórico o Hidróxido de sodio al 0.1 N.

#### **E. Hidrólisis Enzimática**

- Para la determinación de la actividad se utilizó un mini reactor donde se llevó a cabo la hidrólisis para dilución enzimática.
- Se agregó 50 mL de emulsión y 40 mL de tampón citrato fosfato a pH 7.0, se calentó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  durante 5 minutos.
- Luego se agregó 10 mL de enzima en dilución (1:6000, 1:7000 y 1:8000)
- Se sacó muestras de 10 mL cada 5 minutos durante un periodo de reacción de 45 minutos
- Se detuvo la reacción de cada muestra extraída con una solución de 10 mL de acetona con etanol en relación 1:1 y se agitó enérgicamente.
- se tituló cada muestra con NaOH al 0.05 N, para hallar la cantidad generada de ácidos grasos carboxílicos libres.



**Figura 13. Titulación con NaOH al 0.05N las muestras de hidrólisis enzimática**

### F. Actividad Enzimática

Se muestra a continuación la ecuación (1) y (2) a emplear para hallar la actividad enzimática:

$$\frac{\text{umol ácidos grasos}}{\text{ml muestra}} = \frac{[\text{gasto ml (muestra - blanco)}]}{\text{Volumen muestra a titular}} \times N \times 1000 \quad (1)$$

$$\text{Actividad Lipídica } \left(\frac{\text{UI}}{\text{g}}\right) = \frac{\text{pendiente } \left(\frac{\text{umol ácidos grasos}}{\text{ml muestra} \times \text{min}}\right) \times 1000}{\text{Vol. muestra} \times \text{dilución}} \quad (2)$$

Donde:

Volumen de muestra= 10 mL muestra + 10 mL solución de acetona:  
etanol

Dilución = 1/6000, 1/7000 y 1/8000

Pendiente= tendencia lineal en las diluciones 1:6000, 1:7000 y 1:8000

### 3.3.2 Determinación de los parámetros cinéticos

La selección del modelo para hallar la cinética enzimática en la hidrólisis de aceite se basó en el modelo de Michaelis-Menten catalizado por una enzima con un único sustrato. De acuerdo al modelo dado por Michaelis-Menten, la velocidad de reacción se puede determinar para reacciones catalizadas por enzimas mediante la ecuación (3):

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

**Donde:**

V= velocidad de reacción (gramos Ac. Grasos libres formados/ gramos muestra\*minuto)

K<sub>m</sub>= Constante de Michaelis-Menten (gramos Ac. Grasos libres formados/ minuto)

[S] = Concentración de sustrato (gramos de aceite)

Los parámetros cinéticos (K<sub>m</sub> y V<sub>máx.</sub>) se pueden determinar según la curva de regresión lineal presentada por Lineweaver y Burk, (1934) que se presenta en la ecuación (4):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

Al graficar las inversas de la ecuación de Lineweaver y Burk  $1/V$  y  $1/[S]$ , obtendremos la pendiente de esta curva que nos proporciona los valores de  $K_m/V_{m\acute{a}x}$  y el intercepto nos da  $1/V_{m\acute{a}x}$ .

La metodología experimental empleada para hallar los parámetros cinéticos de la enzima fue la siguiente:

1. Se usó emulsión de aceite de oliva como sustrato, en los intervalos de concentración de 137.40 g/L – 251.90 g/L, para la reacción se utilizó una dilución enzimática 1:7000 de AY AMANO 30 SD.
2. Para hallar los parámetros cinéticos se trabajó con una emulsión con 50 % de grasa, solución PVA al 2% y aceite de oliva 1:1.
3. Se realizaron 8 experiencias usando una concentración diferente de sustrato. Las cuales fueron desde 137.40 g/L de grasa hasta 274.80 g/L de aceite.

**Tabla 8. Preparación de concentración de sustrato para determinar los parámetros cinéticos ‘ $K_m$ ’ y ‘ $V_{m\acute{a}x}$ ’**

#Experiencia	Concentración [So] g/L	Emulsión (mL)	Buffer (mL)
1	137.40	15.00	30.00
2	160.30	17.50	27.50
3	183.20	20.00	25.00
4	206.10	22.50	22.50
5	229.00	25.00	20.00
6	251.90	27.50	17.50

Emulsión (mL): 50% de sustrato (aceite de oliva) y 50% de solución PVA%  
 Buffer (mL): Tampón citrato-fosfato pH 7.00 Buffer (mL):

Reacción total 50 mL

4. Se preparó cada experimento según lo que indica el cuadro para cada uno. La mezcla se calentó en baño maría a 37 C durante 5 minutos.

5. Después del período de calentamiento, se añadió 5 mL de enzima de la solución enzimática 1:7000 a cada experimento y se dejó reaccionar por un tiempo de 30 minutos.

6. Después de este periodo de tiempo de reacción, se sacó 5 mL de muestra y se detuvo la reacción con 5 mL una mezcla de acetona y etanol 1:1, se agregó indicador fenolftaleína 2 gotas y luego se procedió a titular para hallar la cantidad de ácidos grasos libres.

### **3.3.3 Determinación del efecto de la temperatura en la actividad lipídica**

La determinación del efecto de la temperatura en la actividad lipídica se determinó mediante la metodología descrita por Gentili, Curini, Cernia, D'Ascenzo (1996), usando la lipasa aislada de *Candida Cylindracea*, trabajando en el rango de temperaturas (35 – 80)°C a pH 7.00 por 30 minutos, analizando la actividad lipídica por el método titrimétrico de ácidos carboxílicos libres liberados en la hidrólisis descrita por Camacho (2014).

### **3.3.4 Determinación de la estabilidad térmica**

Se determinó la estabilidad térmica de la enzima AY AMANO 30 SD influenciada por la temperatura, incubando la enzima a pH 7.00 en un rango de temperaturas y midiendo la actividad después de 1 hora de incubación con la metodología descrita por Mohd Hussin, Attan, y Wahab, (2020). Las temperaturas de incubación fueron las siguientes: 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70 y 80 °C.

### **3.3.5 Determinación de la inactivación Térmica**

La cinética de inactivación térmica se calculó incubando la dilución enzimática preparada 1:7000 a las siguientes temperaturas: 60 °C, 70°C y 80°C por 1 hora,

siguiendo la metodología descrita por Escorcía, et al. (2011). En esta investigación se determinó la actividad residual a condiciones óptimas (50°C, pH 7.00) por 30 minutos (AMANO ENZYME, 2020).

La constante de inactivación ( $K_d$ ) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) se calcularon según la siguiente ecuación (5) de primer orden:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (5)$$

Dónde:

$K_d$ =constante de inactivación  
 $t_{1/2}$ = tiempo de vida media

Para hallar la actividad en función del tiempo se utilizará la siguiente ecuación (6) lineal, la cual, se graficará para obtener la pendiente que nos dará el valor de  $k$ :

$$\ln \frac{[A]}{[A_0]} = -k_d t \quad (6)$$

Los valores resultarán, graficando  $\ln$  (actividad final /actividad inicial) vs. Tiempo de inactivación (min).

Dónde:

$K_d$ =pendiente;  
 $t_{1/2} = \ln(2)/K_d$ .

### **3.3.6 Determinación de análisis fisicoquímico del aceite semi-refinado de anchoveta**

#### **A. Índice de Acidez en aceite de pescado**

La determinación del índice de acidez se realizó según el Método NTP 209.005:1968 (revisada el 2016), el cual mide el grado de acidez de un aceite, también llamada acidez libre siendo el contenido de ácidos grasos libres presentes en el aceite, expresados en tanto por ciento en peso de ácido oleico, el mayoritario en el aceite de pescado.

#### **Expresión de resultados en la ecuación (7):**

$$\%FFA = \frac{G(mL) \times N \times 0.282 \times FC}{Wm} \times 100 \quad (7)$$

#### **Dónde:**

G = Volumen gastado en la titulación de NaOH

N = Normalidad del Hidróxido de Sodio (0.25)

Wm= peso de muestra (g)

FC = Factor de corrección (NREAL/NTEORICA)

#### **B. Determinación de humedad y materia volátil**

La humedad del aceite semi-refinado de anchoveta se determinó por estufa y diferencia de pesos de acuerdo al método NTP 209.004:1968 (revisada el 2016).

**Expresión de resultados en la ecuación (8):**

$$\%HMV = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (8)$$

**Dónde:**

%HMV= % de humedad y material volátil

M<sub>1</sub>= Masa inicial de la muestra

M<sub>2</sub>= Masa de muestra sin humedad y materia volátil

**C. Determinación del índice de saponificación**

El índice de saponificación viene a ser el peso de miligramos de KOH (hidróxido de potasio) necesario para saponificar 1 gramo de grasa, se determinó de acuerdo a la técnica de la NTP 209.058:1980 (revisada el 2016).

**Expresión de resultados en la ecuación (9):**

$$I.S. = \frac{56,1 \times N(V - V'')}{P} \quad (9)$$

**Dónde:**

I.S.= mg de KOH/g (aceite)

V= Volumen en ml de solución de HCl 0.5 N utilizados en la prueba en blanco.

V'' = Volumen en ml de solución HCL 0,5 N utilizados en el ensayo.

N = Normalidad exacta de la solución de ácido clorhídrico utilizado

P = Peso en gramos del aceite.

#### **D. Determinación de índice de yodo**

Es la medida del grado de instauración de los aceites y grasas, a medida que aumentan los dobles enlaces en un ácido graso aumenta también el índice de Yodo, este método se determinó siguiendo la norma del Método Oficial A.O.A.C. 920. 158.

##### **Expresión de resultados en la ecuación (10):**

$$\text{Índice de Yodo} = \frac{(V_B - V_G) \times N \times 12.69}{W_m} \quad (10)$$

##### **Dónde:**

VB = Volumen gastado por el blanco en ml.

VG = Volumen gastado de tiosulfato de sodio en la muestra ml.

N = Normalidad corregida de tiosulfato de sodio.

12.69 = Mili equivalente del Yodo x 100

Wm = Peso de la muestra en g.

#### **E. Determinación de índice de anisidina**

Por convención el índice de anisidina, se define como 100 veces la absorbancia de una solución, que es el producto de la reacción entre 1 g de aceite o grasa en 100 ml de una mezcla de solventes y el reactivo de anisidina. La medición

se realiza a través de una celda de 1 cm de paso de luz. Este análisis se determinó teniendo referencia a la ISO 6885:2006.

**Expresión de resultados en la ecuación (11):**

$$\text{Índice de Anisidina} = \frac{25 \times (1.2 \times A_s \times A_b)}{W_m} \quad (11)$$

**Dónde:**

$A_s$  = Es la diferencia de la absorbancia medida entre la solución de grasa después de la reacción con anisidina y el blanco.

$A_b$  = Es la diferencia de la absorbancia medida entre la solución de grasa y el blanco.

$W_m$  = Peso de la muestra en g.

**F. Determinación de ácidos grasos (AOAC – Official Method 969.33-**

**Fatty Acids in oil and Fats)**

Este método está designado a determinar la composición de ácidos grasos marinos y sus respectivos ésteres en valores relativos (área %) y en valores absolutos (mg/g) de ácido Eicosapentanoico (EPA) y Docosahexanoico (DHA), usando un enlace poliglicol en fase líquida y una columna flexible de sílica. El ácido graso C23:0 es usado como un patrón interno. Este análisis se realizó de acuerdo al método AOAC – Official Method 969.33- Fatty Acids in oil and Fats.

### **3.3.7 Hidrólisis Enzimática**

La reacción de hidrólisis se realizó en un minireactor de 500 mL donde se agregaron 200 g de aceite semi-refinado, 200 g de agua y lipasa cerrado herméticamente con una tapa e incubados en un baño maría termorregulador, la agitación fija a 160 RPM con una pastilla de agitación magnética dentro del minireactor.

La temperatura, concentración de enzima y el tiempo de hidrólisis se fijaron bajo condiciones que se establecieron en el diseño experimental, mientras que la dilución 1:1 respecto al sustrato agua-aceite y el pH 7.00 se estableció por la literatura.

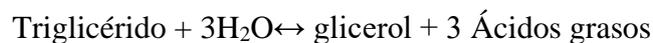
Finalizado el tiempo de la reacción planteada para cada experiencia, se retiró el aceite hidrolizado en tubos cónicos de 15 mL para su centrifugación y separación por diferencia de densidad del sustrato agua-aceite. Se centrifugó por 10 minutos a 5000 rpm.

Después de haber separado el agua y el aceite hidrolizado se midió el grado de hidrólisis de la reacción con la determinación de la fracción de ácidos grasos libres (%FFA)

El diseño DCCR, presentado en la Tabla 9, fue utilizado para estudiar los efectos de las variables: Temperatura, tiempo de reacción, concentración de enzima y % Grado de Hidrólisis.

### 3.3.7.1 Mecanismo de Reacción

La hidrólisis de los triglicéridos catalizada por la lipasa aislada de la *Candida cylindracea*, es una reacción compleja que implica la formación de numerosos grupos (mono-, di-, y triglicéridos) y se lleva a cabo por etapas consecutivas y reversibles. Esta reacción compleja hace que sea difícil obtener una ecuación de velocidad adecuada para la descripción de este fenómeno. (Bhandari, Chaurasia y Singh, 2017). Por lo general, las diversas etapas de la reacción que son la hidrólisis de mono-, di-, y triglicéridos se pueden agrupar juntos con el fin de simplificar el análisis cinético:

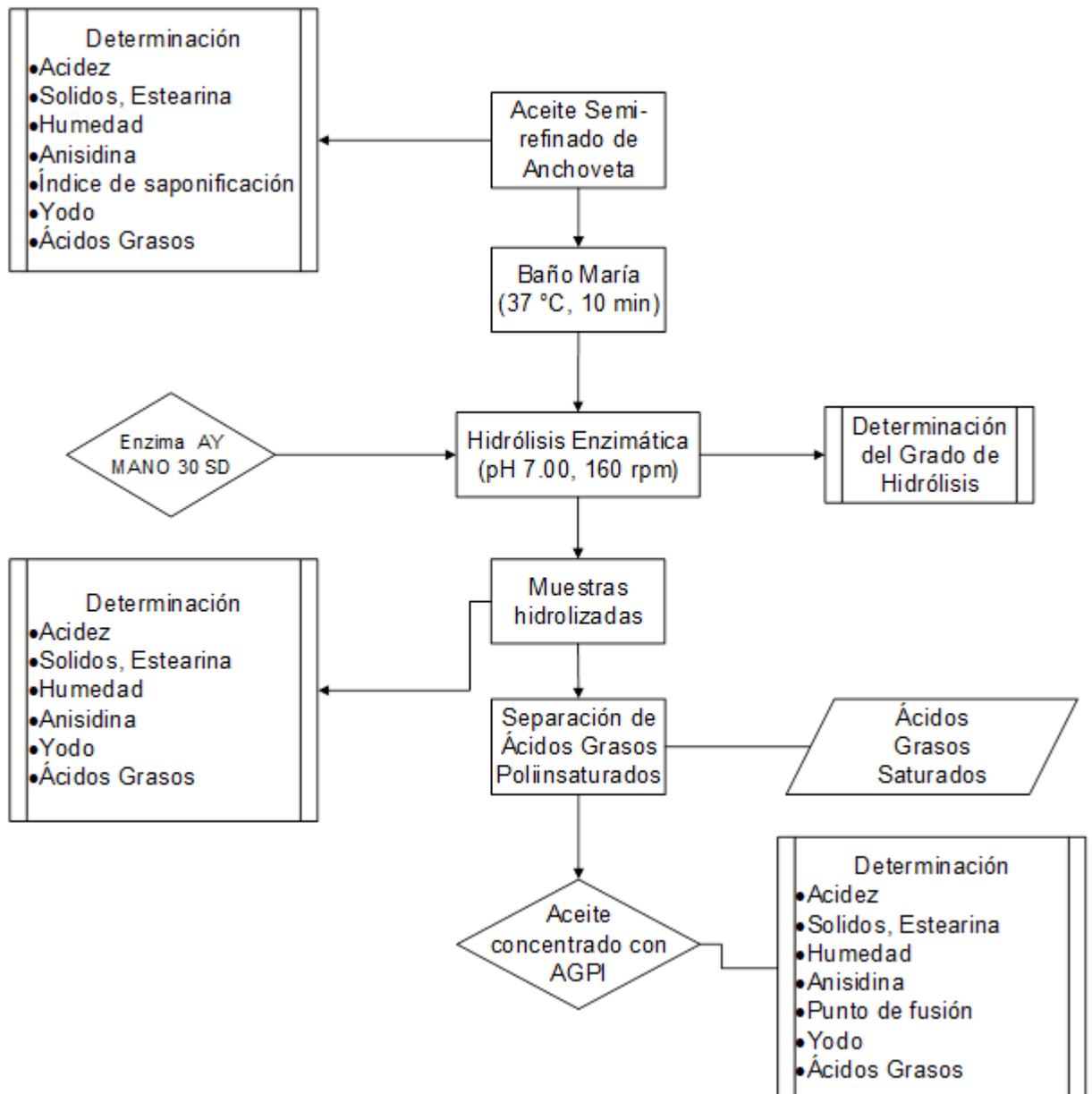


La estructura del centro activo de la lipasa, cuya resolución a alta estructuras tridimensionales se han determinado, reveló una tríada catalítica de subcentros Ser-His-Glu para *Candida rugosa* comúnmente antes conocida como *Candida cylindracea* la cual también tiene una triada catalítica de subcentros como lo manifiesta Gentili, et al. (1996), que están implicados en la unión del sustrato y en la ruptura de los enlaces éster.

### 3.3.7.2 Procedimiento experimental

En la siguiente figura 14, se detalla esquemáticamente las etapas que comprenden el proceso de obtención de aceite semi-refinado concentrado de anchoveta por acción enzimática, así como los análisis que se realizaron como parte del estudio.

**Figura 14. Diagrama de Flujo del Proceso Experimental**



**Tabla 9. Niveles de las variables independientes usados en el diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR)**

Variables Independientes	Niveles				
	-1.68	-1	0	1	1.68
Temperatura (°C)	40	42	45	48	50
Concentración de Enzima (U/mL)	200	261	350	439	500
Tiempo de hidrólisis (Horas)	12	19	30	41	48

**Tabla 10. Ensayos del diseño experimental Compuesto Central Rotacional (DCCR), variando concentración de enzima [E], tiempo (t) y temperatura (T)**

N° Ensayo	Variables independientes					
	Codificado			Real		
	[E] U/mL	t Horas	T °C	[E] U/mL	t Horas	T °C
1	-1	-1	-1	261	19	42
2	1	-1	-1	439	19	42
3	-1	1	-1	261	41	42
4	1	1	-1	439	41	42
5	-1	-1	1	261	19	48
6	1	-1	1	439	19	48
7	-1	1	1	261	41	48
8	1	1	1	439	41	48
9	-1.68	0	0	200	30	45
10	1.68	0	0	500	30	45
11	0	-1.68	0	350	12	45
12	0	1.68	0	350	48	45
13	0	0	-1.68	350	30	40
14	0	0	1.68	350	30	50
15	0	0	0	350	30	45
16	0	0	0	350	30	45
17	0	0	0	350	30	45

En la tabla 10 se muestran los valores que fueron utilizados en el planeamiento, utilizando la mejor alternativa para tres variables el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) donde se consideraron los puntos axiales y centrales (Rodríguez y Lemma, 2005),

Según las variables (Tabla 12):

- Independientes: Temperatura, Concentración de enzima y tiempo de hidrólisis.
- Dependientes: %Grado de hidrólisis

### 3.3.8 Determinación del grado de hidrólisis

La determinación del grado de hidrólisis será a base de la cuantificación porcentual de la fracción de ácidos grasos libres, valorados con NaOH 0.025 N usando el método NTP 209.005:1968 (revisada el 2016) y para hallar el grado de saponificación se tomará el método la NTP 209.058:1980 (revisada el 2016), luego de la hidrólisis del aceite. (Bhandari, Chaurasia y Singh, 2017)

Para calcular y expresarlo como % de hidrólisis se utilizó la siguiente ecuación (12):

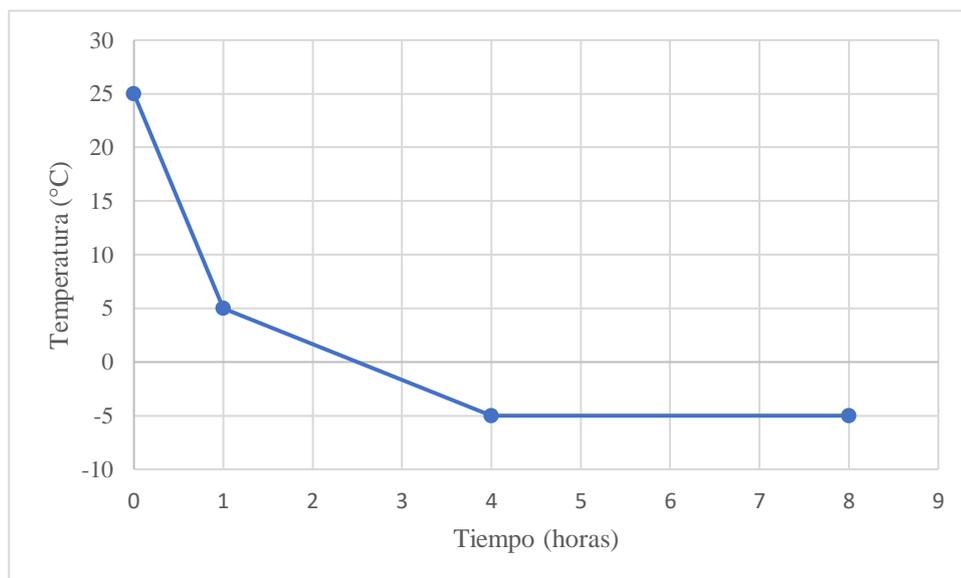
$$\%Hidrólisis = \frac{Acidez (Aceite hidrolizado) - Acidez (Aceite original)}{Grado de Saponificación (aceite original) - Acidez (Aceite original)} \times 100 \quad (12)$$

De esta ecuación podremos obtener los ácidos grasos hidrolizados sobre el índice Ester (índice de saponificación – el índice de acidez) lo que permite obtener una mejor aproximación del peso molecular promedio de los triglicéridos de una grasa.

### 3.3.9 Obtención de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3

Para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados se trabajará con el punto óptimo del diseño estadístico, se replicará experimentalmente y luego se realizará la separación agua:aceite para obtener la muestra hidrolizada.

- Primera etapa de enfriamiento: Para la hibernación del aceite hidrolizado, se enfriará de 25°C hasta 5°C por una hora.
- Segunda etapa de enfriamiento: Se usará un solvente orgánico (hexano al 40%) con el objetivo de incrementar la velocidad de transferencia de masa y cristalización de las fracciones de ácidos grasos saturados, se llevará hasta -5°C en cuatro horas.
- Tercera etapa de enfriamiento: Se mantendrá a -5°C por cuatro horas
- Filtración: Se logrará filtrar los ácidos grasos saturados a -5°C con la ayuda de una jeringa y malla de algodón.



**Figura 15. Curva de enfriamiento para la separación de Ácidos grasos saturados**

Fuente: Bernardini (1991)

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Composición fisicoquímica del aceite semi-refinado de anchoveta

La composición físico química del aceite semi-refinado de anchoveta se detalla en la siguiente tabla.

**Tabla 11. Composición Físico química del aceite semi-refinado de anchoveta**

Análisis	Media $\pm$ desviación estándar
Acidez %	0.130 $\pm$ 0.020
Impurezas Sólidas %	<0.01
Humedad %	0.017 $\pm$ 0.004
Estearina %	<0.01
Índice de Anisidina	11.29 $\pm$ 0.318
Índice de Yodo	187.15 $\pm$ 0.569

Según el código STAN 329-2017 adoptado el 2017 para aceite de pescado para consumo humano directo, fija los siguientes parámetros para aceite acidez < 3 mg KOH/g y anisidina < 20, por lo cual el aceite semi-refinado se encuentra dentro del rango establecido por esta norma.

En el caso del índice de Yodo según la NTP 312.003:1970 (Revisada el 2010) menciona que el aceite de anchoveta semi-refinado debe estar en un intervalo de 175 – 196, por lo cual el aceite semi-refinado en este estudio también se mantiene en el rango debido a que el proceso de semi-refinado del aceite de pescado no sufre cambios bruscos en el proceso por no usar altas temperaturas, lo que evita la degradación de Ácidos grasos poliinsaturados que están relacionados con la insaturación del aceite y directamente con la medida de este parámetros.

**Tabla 12. Composición de ácidos grasos del aceite semi-refinado de anchoveta antes del proceso de hidrólisis enzimática**

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre común del ácido graso</b>	<b>%</b>
C14:0	Ácido mirístico	8.29
C16:0	Ácido palmítico	18.09
C18:0	Ácido esteárico	3.68
C20:0	Ácido araquídico	0
C22:0	Ácido behénico	0
C23:0	Ácido Tricosanoico	0
C24:0	Ácido Tetracosanoico	0.83
<b>Total AGS</b>		<b>30.89</b>
C24:1	Ácido nervónico	0
C22:1	Ácido erúxico	0
C20:1	Ácido gadoleico	0.74
C18:1 VAC	Ácido vaccénico	9.09
C18:1 OLE	Ácido oleico	2.92
C16:1	Ácido palmitoleico	8.11
C14:1	Ácido mirístoleico	0
<b>Total AGM</b>		<b>20.86</b>
C20:4 (n-6)	Ácido araquidónico	1.02
C20:2 (n-6)	Ácido eicosadenoico	0
C18:2 (n-6)	Ácido linoleico	1.16
<b>Total AGP n-6</b>		<b>2.18</b>
C20:3 (n-3)	Ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico	0
C18:3 (n-3)	Ácido $\gamma$ -linolénico	1.26
C22:6 DHA (n-3)	Ácido docosahexaenoico	11.53
C20:5 EPA (n-3)	Ácido eicosapentaenoico	18.95
<b>Total AGP n-3</b>		<b>31.74</b>

El EPA (C20:5) y DHA (C22:6) son ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega-3 que son muy valorados en la industria del aceite como requisito que obedece a parámetros de comercialización. En el mundo se conoce que la anchoveta es una especie azul pelágica de la cual se extrae aceite con altas concentraciones de omega-3 así como lo reportan los siguientes autores: 27.0 % AGP n-3 (Yıldız, et al. 2018), 52.54% AGP n-3 (Maza Ramírez, Aldoradín Puza, Pariona Velarde, Arpi Anco y Rosales-Hartshorn, 2016), 29.1 a 33.1% en EPA y DHA (Salas et al. 2003) , en comparación de lo obtenido

en esta investigación de 30.48% en AGP n-3 (EPA y DHA) se encuentra dentro del rango encontrado en la literatura, la diferencia de la composición de ácidos grasos en los aceites de las especies marinas varía según la estación, el área de captura, dieta, edad y madurez sexual.(Carrizo, 1999; Bimbo, 1999).

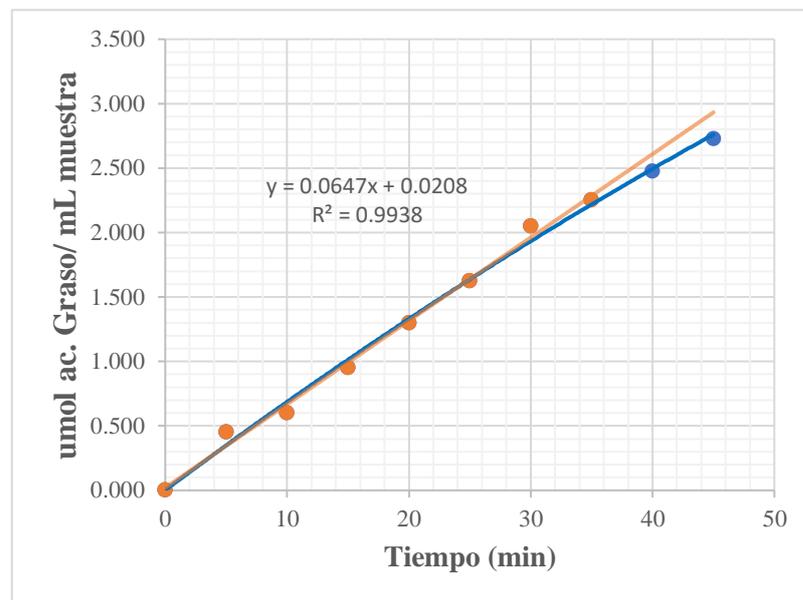
#### **4.2 Determinación de la actividad lipídica**

Las actividades de la enzima AY AMANO 30 SD a las diluciones 1:6000, 1:7000 y 1:8000, se halló el rango de linealidad gráficamente a los tiempos de 35, 30 y 25 minutos (Figura 16, 17 y 18), las cuales resultaron  $36\ 972.79 \pm 305.009$  U/g,  $37\ 420.38 \pm 153.415$  U/g y  $37\ 760.48 \pm 124.271$  U/g respectivamente, trabajando con un sustrato de emulsión de aceite de oliva al 12.5%, las 3 actividades fueron halladas a las mismas condiciones de reacción pH 7.00 y agitación constante de 160 RPM.

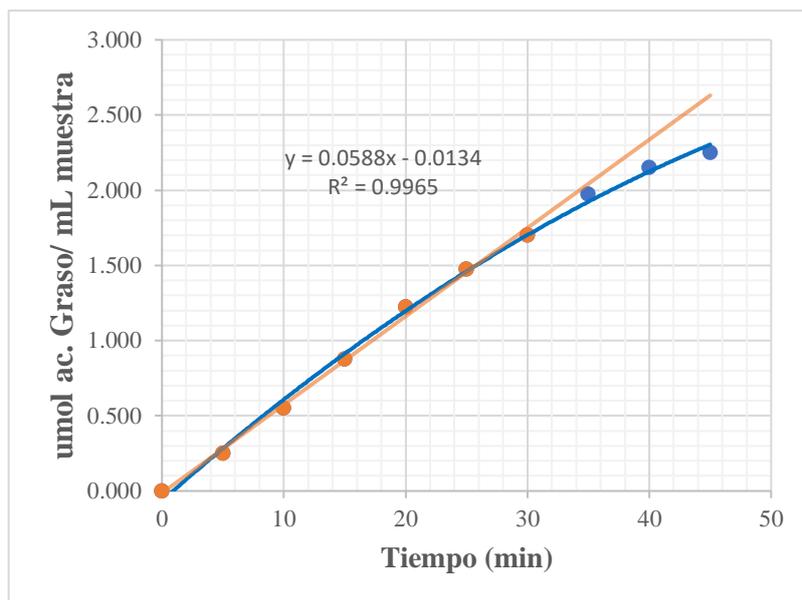
Según el certificado de análisis de esta enzima comercial reporta que la actividad de es de 38 000 U/g pero no debe ser menor de 30 000 U/g, es claro que los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango indicado por el fabricante encontrándose en un promedio de  $37\ 384.55 \pm 194.232$  U/g, siendo U la cantidad de micromoles equivalentes de ácido graso liberado por minuto.

Es preciso indicar que otros autores pueden reportar actividades diferentes a esta investigación para la enzima aislada de la *Candida Cylindracea*, como en el caso de Wanasundara y Shahidi (1998) donde obtienen una actividad de 22 500 U/g usando como sustrato tributirina, como se puede apreciar, esta diferencia va a depender del método empleado y las condiciones brindadas a la enzima que va a ser utilizada en un proceso.

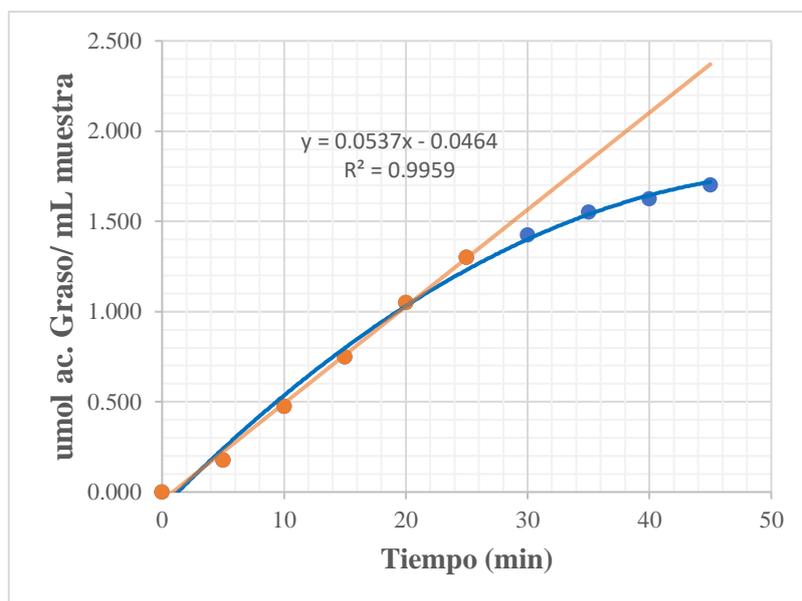
En la figura 16, 17 y 18 se muestran típicas curvas de la liberación de productos en este caso de micromoles de ácidos grasos por cada mililitro de muestra en función del tiempo para una reacción catalizada a tres diferentes concentraciones de enzima AY AMANO 30 SD 1:6000, 1:7000 y 1:8000.



**Figura 16. Determinación del rango de linealidad a dilución 1:6000**



**Figura 17. Determinación del rango de linealidad a dilución 1:7000**



**Figura 18. Determinación del rango de linealidad a dilución 1:8000**

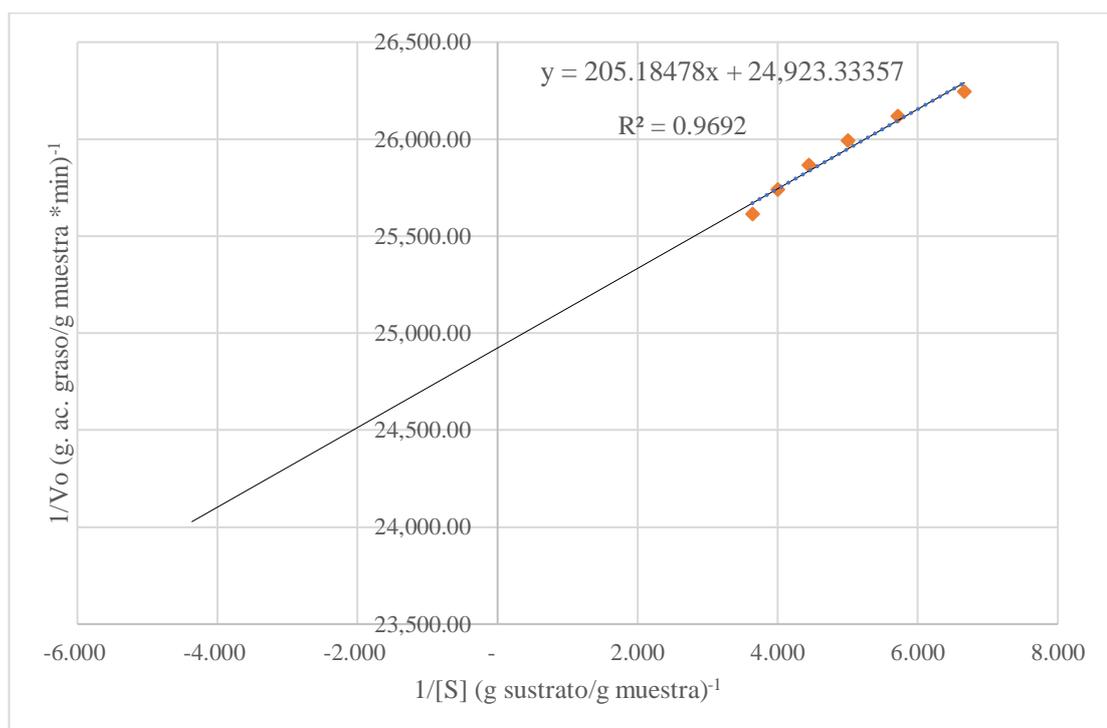
### 4.3 Determinación de parámetros cinéticos

Se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima AY AMANO 30 SD ( $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) empleando la curva de regresión lineal de Lineweaver y Burk, (1934) como herramienta gráfica. A continuación, se presenta la ecuación de Lineweaver y Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$

**Tabla 13. Reacción de velocidad de hidrólisis a diferentes concentraciones de sustrato**

N°	[So]g/L	[So]g/g	V (g/g)	1/S	1/V
1	137.40	0.150	0.0000381	6.667	26,246.15
2	160.30	0.175	0.0000383	5.714	26,120.03
3	183.20	0.200	0.0000385	5.000	25,993.91
4	206.10	0.225	0.0000387	4.444	25,867.79
5	229.00	0.250	0.0000388	4.000	25,741.67
6	251.90	0.275	0.0000390	3.636	25,615.55



**Figura 19. Gráfica de Lineweaver-Burk para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima AY AMANO 30 SD.**

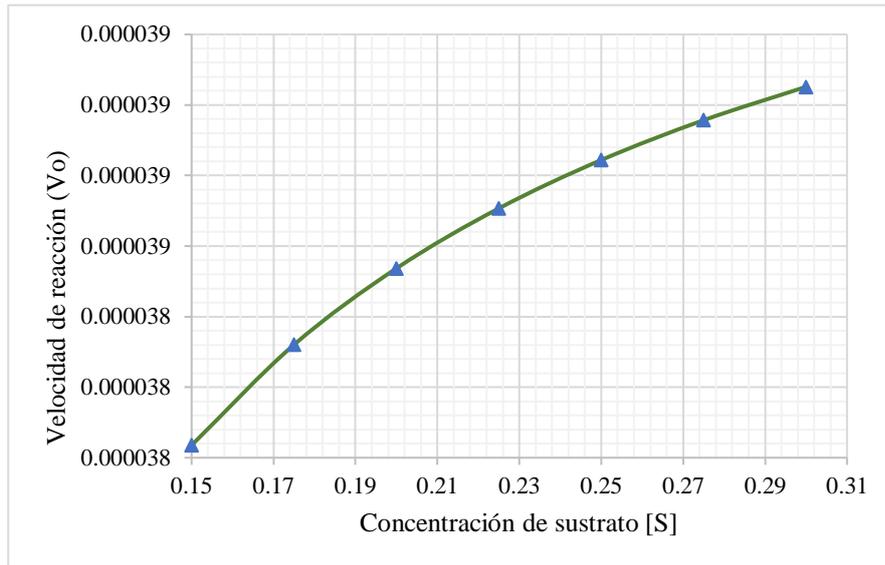
Donde:

$$\frac{1}{V}(y) = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}}(205.18478) \times \frac{1}{[S]}(x) + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}(24923.33357)$$

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos gráficamente con la ecuación de la curva los cuales son: la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de 7.98 g/L y la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de 0.038887 g/L×min con un  $R^2=0.9692$ , variando las concentraciones de la emulsión de aceite en la mezcla de reacción entre 137.40 g/L – 251.9 g/L, trabajando a la temperatura de 37 °C y al pH 7.0.

Las constantes de los parámetros cinéticos de la lipasa *Candida cylindracea* de la empresa SIGMA ALDRICH fueron reportados por Sharma, A. et. al. (2013) resultando así un  $K_m= 2.57$  g/L y un  $V_{m\acute{a}x}= 9.82$  g/Lxmin, donde notablemente hay una diferencia significativa en la constante de Michaelis-Menten, esto se debe a que hay una mayor afinidad de esta enzima con el sustrato. La velocidad máxima también se encuentra en un nivel superior a lo reportado en esta investigación debido a que las condiciones para la hidrólisis fueron diferentes, usando un solvente orgánico (isooctano) para facilitar la separación de los productos formados.

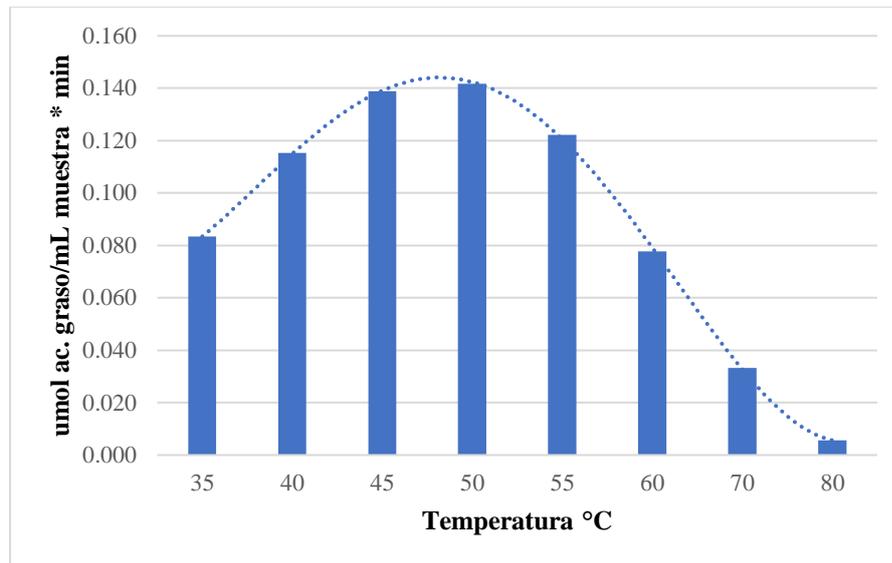
Para el estudio de la cinética enzimática de la enzima AY AMANO 30 SD se graficó V frente [S], obteniendo la figura 20, interpretándose que el rango de [S] empleado ayudó a obtener los parámetros cinéticos, cumpliéndose que cuando el [S] es menor, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración del sustrato y por lo tanto la reacción es de primer orden, pero cuando los sitios activos de la enzima se encuentren saturados por el sustrato, alcanzará su Velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ).



**Figura 20. Concentración de sustrato Vs. Velocidad de reacción**

#### **4.4 Efecto de la temperatura**

Como se muestra en la figura 21, la actividad de la enzima AY AMANO 30 SD fue altamente sensible pasado los 60 °C, disminuyendo su actividad a temperaturas más altas. La actividad al 100% se observó a la temperatura óptima de 50°C, lo que confirma con referencia a la ficha técnica enviada por el fabricante. Por otro lado, autores como Gentili *et al.* (1996), reportan en su investigación que la lipasa aislada de *Candida cylindracea* presenta el 100% de su actividad máxima a 45 °C, lo cual difiere de los resultados obtenidos en esta investigación, esto se debe al método utilizado y a las condiciones (sustrato: tributirina, pH 7.4) para determinar la actividad lipídica.



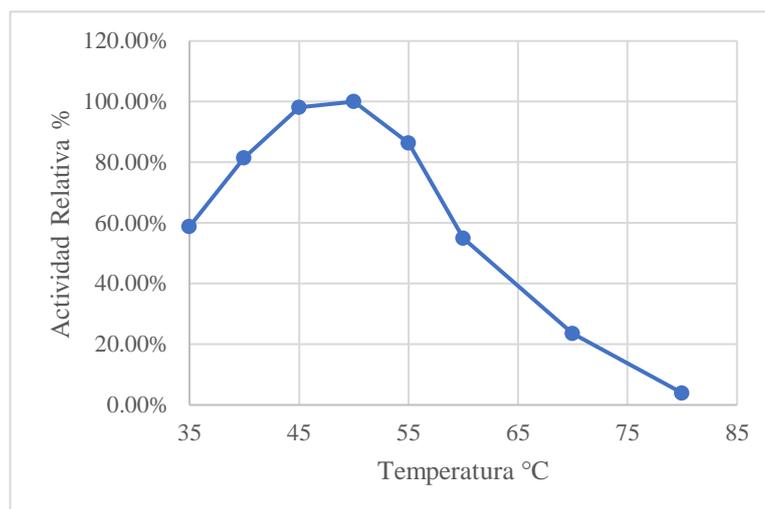
**Figura 21. Efecto de la temperatura usando enzima AY AMANO 30SD**

El efecto de la temperatura sobre la enzima según la figura 21, mostró un descenso brusco de la actividad a partir de la temperatura de 55°C como se muestra en la tabla 14, conservando y mostrando una actividad significativa solo en el rango de 35 – 50 °C, mientras que a temperaturas de 60 -80°C la enzima mantiene su actividad relativa solo hasta el 17.60%. Las bajas temperaturas de trabajo demuestran la condición favorable para un mayor ahorro de energía y condición suave que no perjudiquen la calidad del sustrato durante la aplicación de la lipasa en diferentes industrias como lo menciona Dobrev G. *et.al.* (2011).

**Tabla 14. Resumen de Actividad Relativa% Vs Temperatura**

Temperatura °C	Actividad Relativa %
35	58.80
40	81.40
45	98.00
50	100.00
55	86.30
60	54.90
70	24.70
80	17.60

A continuación, se muestra gráficamente la tendencia de la actividad relativa% con la temperatura.



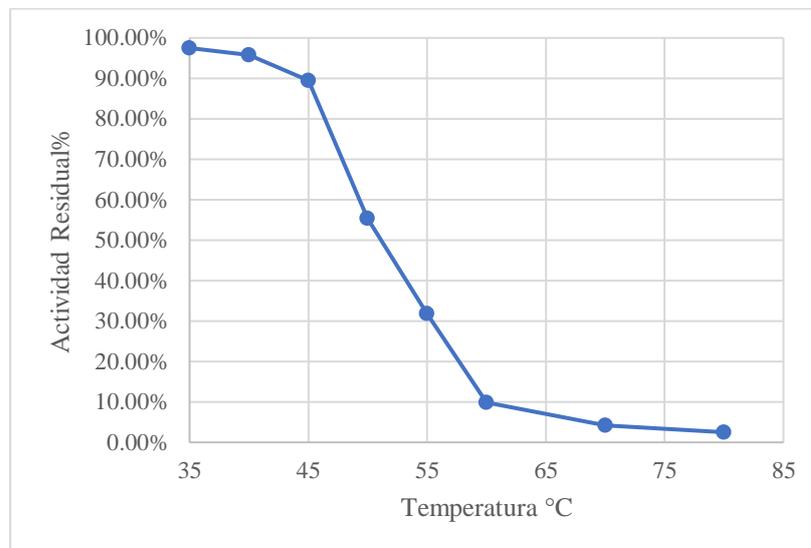
**Figura 22. Actividad relativa% de la enzima AY AMANO 30 SD**

#### 4.5 Estabilidad térmica

Tal y como se muestra en la figura 23, se puede apreciar que, a la temperatura de 50 °C, la enzima mantiene la actividad residual hasta 55.40% y la va perdiendo progresivamente hasta 80°C quedándose solo con el 2.5% de su actividad residual. Por lo tanto, los resultados demuestran que la enzima resultó siendo muy estable en el rango 35 - 45 °C donde mantiene una actividad residual de 97.5% - 89.5% respectivamente. Este perfil de actividad residual Vs Temperatura es similar para los presentados por otros autores con respecto a lipasas fúngicas como en el caso de Coca, *et. al.*, (2001) con la lipasa extraída de *Aspergillus niger* mostrando una estabilidad térmica en el rango de 30 – 40 °C manteniendo una actividad residual de 98-90% respectivamente. Otra lipasa de origen fúngico es la lipasa extracelular de *Marinobacter sp.* estudiada por Fernández-Jerí, *et. al.* (2013) que reportan su estabilidad térmica de 37-45 °C, del mismo modo Benjamin y Pandey (1998), reportan la estabilidad térmica de lipasas aisladas de *Candida rugosa* DMS 203 en un rango de 35-40°C. La estabilidad térmica

de la enzima se ve afectada a temperaturas mayores a 50 °C como lo mencionan Diestra Balta, Margarito Aguilar, Vega Paulino, y Castillo Calderón (2015) en su investigación, debido al debilitamiento de fuerzas intermoleculares que ayudan a conservar la estructura tridimensional de las enzimas, lo que un cambio brusco de temperatura se traduce en la pérdida de la capacidad catalítica.

Cabe señalar que queda demostrado que la enzima de la *Candida cylindracea* estudiada en esta investigación, tiene el mismo comportamiento térmico a otras lipasas de origen fúngico.



**Figura 23. Estabilidad térmica de la enzima AY AMANO 30 SD**

#### 4.6 Inactivación térmica

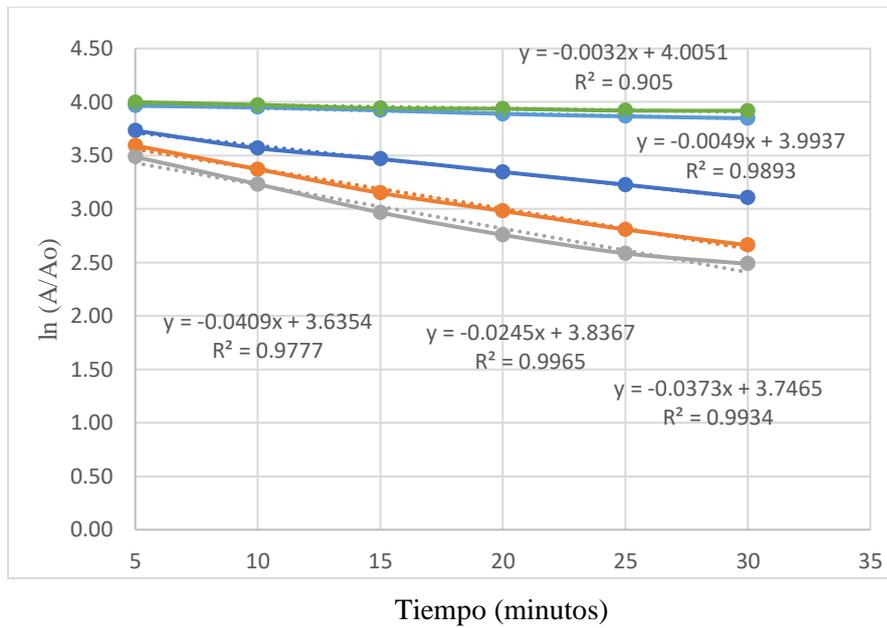
La preparación enzimática fue incubada durante 1 hora a 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C y 80 °C donde retuvo 50.4%, 47.0%, 22.3 %, 14.3 % y 12% de actividad residual por 30 minutos de reacción a condiciones óptimas (50 °C y pH 7.00).

Se determinaron los parámetros de cinéticos de inactivación térmica, resultando luego de los 60 min de incubación una vida media de 219.91 min, 135.41 min, 24.74 min, 16.22 min y 14.22 min respectivamente (Tabla 15).

**Tabla 15. Constante de Inactivación ( $k_d$ ) y tiempo de vida media  $t_{1/2}$**

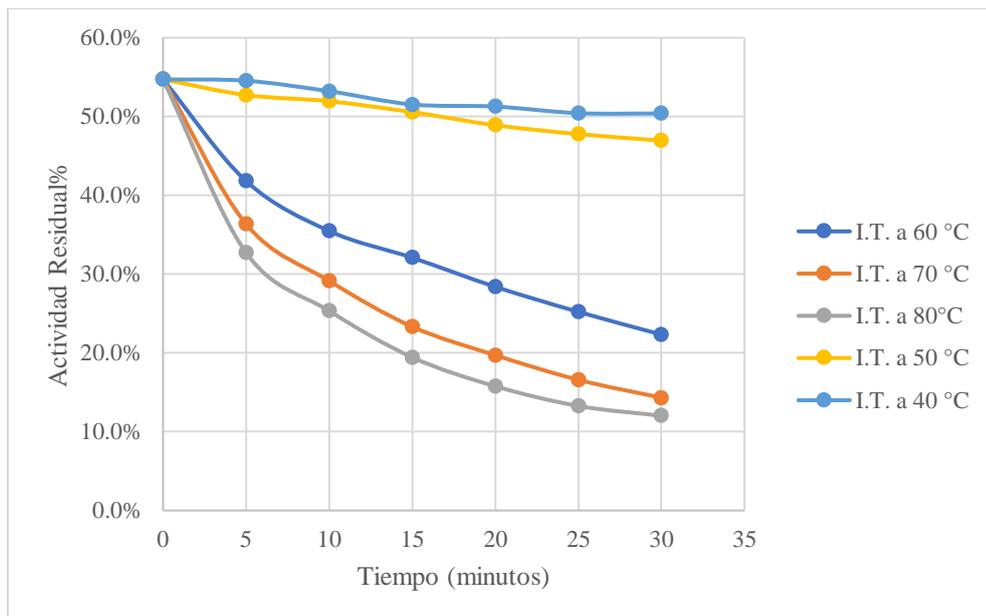
Temperatura (°C)	$K_d$	$t_{1/2}$ (min)	$R^2$
40	0.0031	219.91	0.9050
50	0.0051	135.41	0.9893
60	0.0280	24.74	0.9965
70	0.0427	16.22	0.9934
80	0.0487	14.22	0.9777

A continuación, se presenta la gráfica de para hallar los parámetros cinéticos de inactivación térmica, incubados a 40, 50, 60, 70 y 80 °C por 60 minutos a pH 7.00.



**Figura 24. Gráfica para hallar los parámetros cinéticos de inactivación térmica**

De acuerdo a las temperaturas trabajadas para hallar los parámetros cinéticos de inactivación es comparable a la investigación de Fernández-Jerí, *et. al.* (2013) exponiendo así, que el rango de temperaturas de inactivación de una lipasa de origen fúngico se dan a partir de 60 °C.



**Figura 25. Inactivación térmica de la enzima AY AMANO 30 SD**

#### 4.7 Hidrólisis enzimática

Se inició la hidrólisis enzimática del aceite semi-refinado de anchoveta a las condiciones pH 7.00 y agitación constante. Las primeras dos horas de la reacción hubo cambio de color en el aceite tornándose más oscuro y turbio debido a la hidrólisis y autooxidación del aceite en alta concentración de agua por lo cual influye en las modificaciones organolépticamente (Tena, Lobo-Prieto, Aparicio, & García-González, 2018).



**Figura 26. Proceso de hidrólisis enzimática en el aceite semi-refinado de anchoveta**



**Figura 27. Aceite semi-refinado de anchoveta antes y después de la hidrólisis enzimática.**

#### 4.8 Evaluación del Grado de Hidrólisis

En la tabla 16 se muestran a detalle los valores obtenidos en el grado de hidrólisis para las 17 experiencias del diseño experimental utilizado en esta investigación.

Los valores variaron desde 18.75% hasta 25.29%, para cada una de las condiciones utilizadas en el proceso. Los puntos centrales para la variable de respuesta presentaron una variación menor a 0.07%, indicando buena reproducibilidad del proceso.

**Tabla 16. Resultados experimentales del grado de hidrolisis en los 17 ensayos del diseño experimental**

N° Ensayo	Variables independientes						%GRADO HIRÓLISIS
	Codificado			Real			
	[E] U/mL	t Horas	T °C	[E] U/mL	t Horas	T °C	
1	-1	-1	-1	261	19	42	21.81
2	1	-1	-1	439	19	42	22.21
3	-1	1	-1	261	41	42	20.80
4	1	1	-1	439	41	42	22.19
5	-1	-1	1	261	19	48	24.06
6	1	-1	1	439	19	48	25.45
7	-1	1	1	261	41	48	18.75
8	1	1	1	439	41	48	21.04
9	-1.68	0	0	200	30	45	22.26
10	1.68	0	0	500	30	45	24.10
11	0	-1.68	0	350	12	45	24.13
12	0	1.68	0	350	48	45	19.05
13	0	0	-1.68	350	30	40	20.28
14	0	0	1.68	350	30	50	22.37
15	0	0	0	350	30	45	22.11
16	0	0	0	350	30	45	21.98
17	0	0	0	350	30	45	22.05

Los valores del grado de hidrolisis utilizando la metodología Diseño Central. Compuesto Rotacional (DCCR), varió desde 18.75 a 25.45%. bajo variaciones sistemáticas de los niveles altos y bajos de la concentración enzimática (E), temperatura (T) y tiempo de reacción (t).

Los efectos de los factores lineales, factores cuadráticos y de las interacciones lineales sobre el grado de hidrólisis se presentan en la Tabla 17, donde los valores en negrita son significativos al 95% de confianza ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 17. Efecto estimado, error estándar, coeficiente t y significancia estadística para cada factor en el modelo codificado para la respuesta Grado de Hidrólisis**

	<b>Efecto</b>	<b>Error estándar</b>	<b>t (11)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Media</b>	<b>22.04429</b>	<b>0.165521</b>	<b>133.1810</b>	<b>&lt;0.000001</b>
<b>E (L)</b>	<b>1.25299</b>	<b>0.155605</b>	<b>8.0524</b>	<b>0.000087</b>
<b>E (Q)</b>	<b>0.80997</b>	<b>0.170032</b>	<b>4.7637</b>	<b>0.002051</b>
<b>T (L)</b>	<b>-2.83525</b>	<b>0.156324</b>	<b>-18.1370</b>	<b>&lt;0.000001</b>
T (Q)	-0.31628	0.173247	-1.8256	0.110655
<b>t (L)</b>	<b>0.85509</b>	<b>0.157491</b>	<b>5.4294</b>	<b>0.000977</b>
<b>t (Q)</b>	<b>-0.52562</b>	<b>0.178589</b>	<b>-2.9432</b>	<b>0.021615</b>
E × T	0.47250	0.203488	2.3220	0.053237
E × t	0.47250	0.203488	2.3220	0.053237
<b>T × t</b>	<b>-2.17250</b>	<b>0.203488</b>	<b>-10.6763</b>	<b>0.000014</b>

A través de la tabla 20, para la respuesta grado de hidrólisis, se observa que los factores E(L), E(Q), t(L) presentan un efecto significativo y directamente proporcional en el grado de hidrólisis, es decir, el aumento de estas variables aumenta el valor del grado de hidrólisis. Así como, un efecto inversamente proporcional para los factores T(L), t(Q) y la interacción T × t. Se observó que los factores T(Q) y las interacciones entre las variables E×T y E × t se consideraron estadísticamente no significativas en la respuesta grado de hidrólisis, al nivel de significancia del 5%.

Se verificó la significancia de la regresión al nivel de confianza del 95%, a través del análisis de varianza (ANOVA), utilizando el valor-p. En la tabla 18 se encuentran los valores calculados de p.

**Tabla 18. Análisis de varianza del modelo de respuesta grado de hidrólisis**

	Suma de cuadrado	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
<b>E (L)</b>	<b>5.36975</b>	<b>1</b>	<b>5.36975</b>	<b>64.8405</b>	<b>0.000087</b>
<b>E (Q)</b>	<b>1.87927</b>	<b>1</b>	<b>1.87927</b>	<b>22.6924</b>	<b>0.002051</b>
<b>T (L)</b>	<b>27.24199</b>	<b>1</b>	<b>27.24199</b>	<b>328.9506</b>	<b>0.000000</b>
T (Q)	0.27601	1	0.27601	3.3329	0.110655
<b>t (L)</b>	<b>2.44127</b>	<b>1</b>	<b>2.44127</b>	<b>29.4787</b>	<b>0.000977</b>
<b>t (Q)</b>	<b>0.71737</b>	<b>1</b>	<b>0.71737</b>	<b>8.6623</b>	<b>0.021615</b>
E × T	0.44651	1	0.44651	5.3917	0.053237
E × t	0.44651	1	0.44651	5.3917	0.053237
<b>T × t</b>	<b>9.43951</b>	<b>1</b>	<b>9.43951</b>	<b>113.9833</b>	<b>0.000014</b>
Error	0.57970	7	0.08281		
Total	49.98971	16			
R <sup>2</sup>	97.349				

Los valores p pueden indicar que tan compatibles son los datos con cierto modelo estadístico. El valor-p para cada término comprueba la hipótesis nula de que el coeficiente es igual a cero (no tiene efecto). Las variables E (L), E (Q), T(L), t (L), t(Q) y T × t presentaron un valor-p bajo ( $< 0.05$ ) indicando que se rechaza la hipótesis nula. En otras palabras, es probable que tengan una adición significativa al modelo planteado porque los cambios en sus niveles altos y bajos de los valores en negrita presentados en la Tabla 18 están relacionados con cambios en la variable de respuesta (grado de hidrólisis).

El coeficiente de determinación para el modelo fue de 0.97349 para el grado de hidrólisis, indicando que el modelo obtenido explica el 97.349% de la variación de los datos observados para el grado de hidrólisis. La introducción de interacciones lineales

aumentó la varianza explicada en el modelo utilizado. Además, la comparación de la suma de los residuos absolutos entre el grado de hidrólisis medido y previsto, finalmente confirmo este modelo.

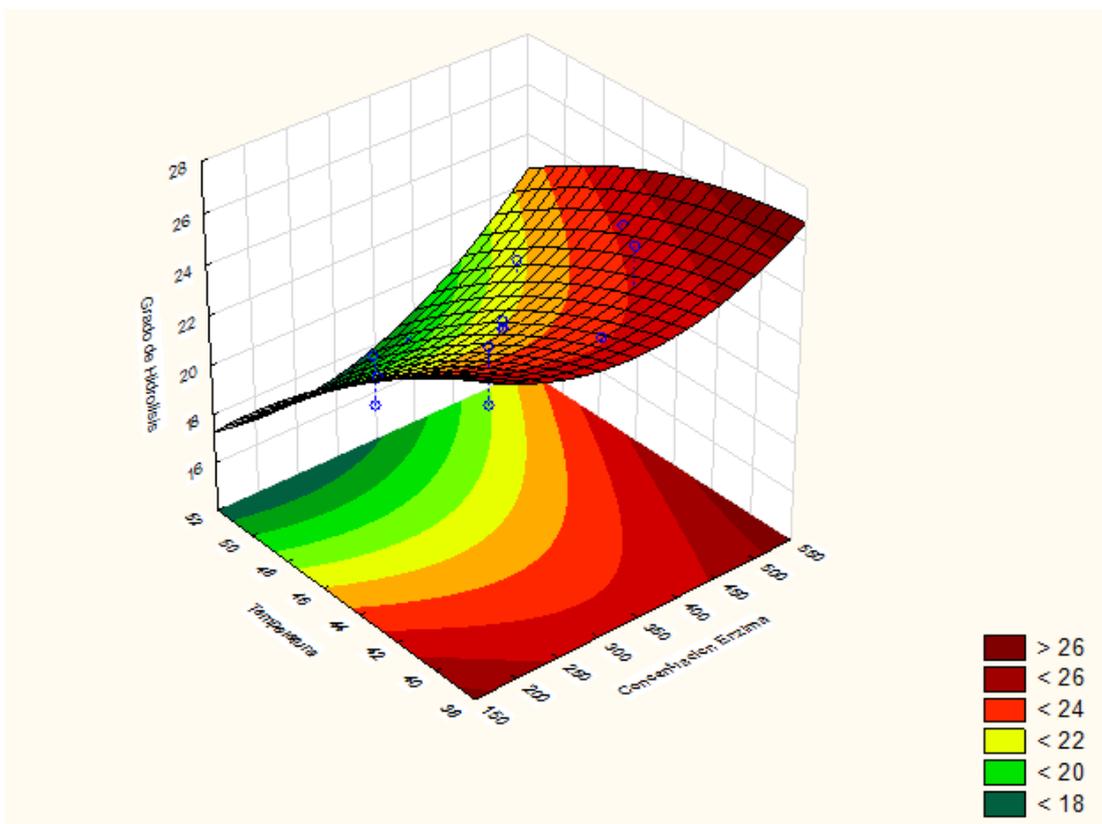
Por lo tanto, el modelo matemático obtenido para los experimentos realizados para la respuesta %GH, en la hidrólisis enzimática de aceite semi-refinado, es:

$$\text{GH (\%)} = -19.5621 - 0.0758 \times E + 0.0001 \times E^2 + 1.7867 \times T - 0.0176 \times T^2 + 1.5660 \times t - 0.0022 \times t^2 + 0.0009 \times E \times T + 0.0002 \times E \times t - 0.0329 \times T \times t$$

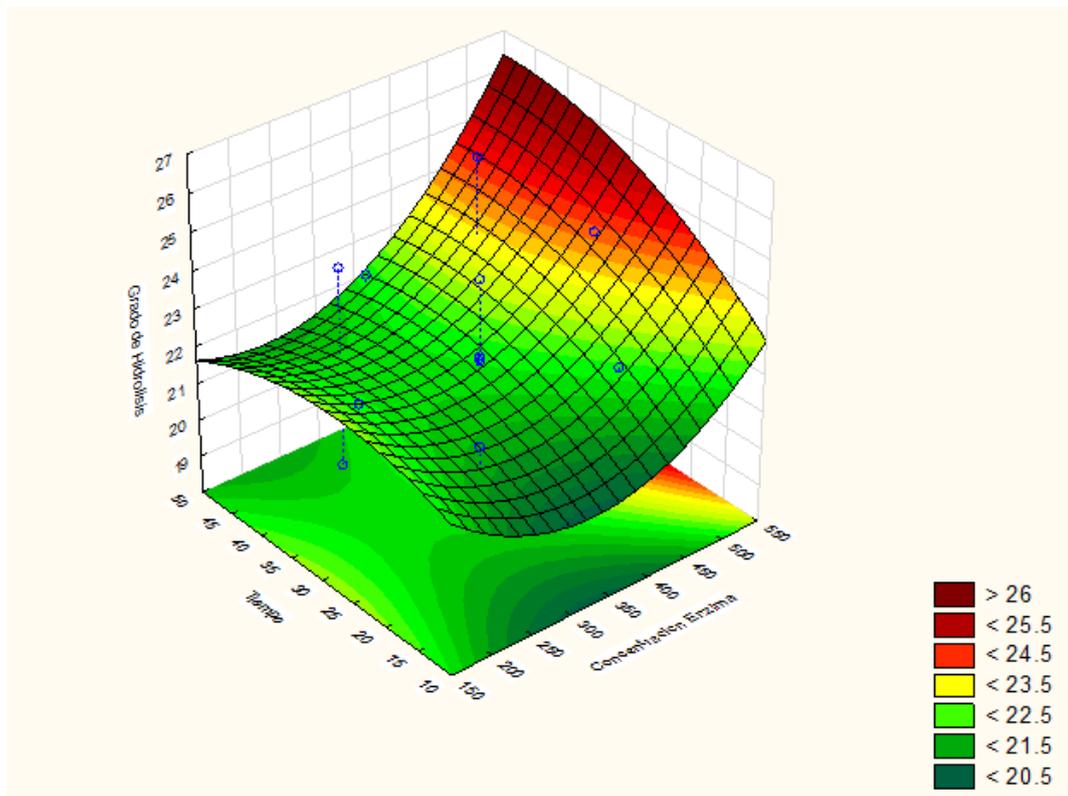
Dónde: GH es el grado de hidrólisis, (%); E es la concentración enzimática, (U/mL);

T es la temperatura de hidrólisis (°C), t es el tiempo de reacción (horas).

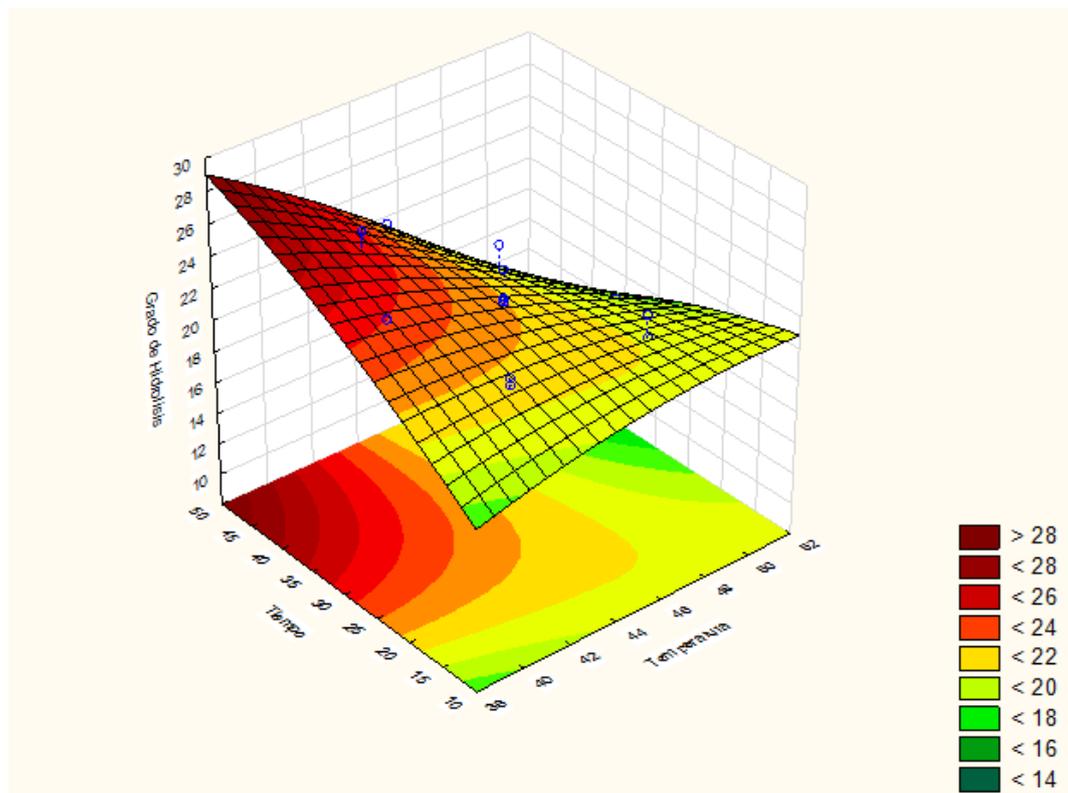
En la figura 28, se muestra las superficies de respuesta generadas a través del modelo propuesto para el grado de hidrólisis “GH”. La figura 28(A), expresa la interacción entre las variables ‘E’ y ‘T’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘t’ en el punto central. La figura 28(B), expresa la interacción entre las variables ‘E’ y ‘t’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘T’ en el punto central. La figura 28(C), expresa la interacción entre las variables ‘T’ y ‘t’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘E’ en el punto central.



(A)



(B)



(C)

Figura 28. Superficies de respuesta graficadas a partir del modelo de grado de hidrolisis.

La figura 28 (A) muestra que al incrementar la concentración enzimática y disminuir la temperatura de reacción, conduce al aumento del grado de hidrólisis. La figura 28 (B) muestra que, al incrementar la concentración enzimática y el tiempo de reacción, conduce a un aumento significativo del grado de hidrólisis. La figura 28 (C) muestra que, al incrementar el tiempo y disminuir la temperatura de reacción, conduce al aumento del grado de hidrólisis.

#### **4.8.1 Efecto de la concentración de enzima**

Se observó en la figura 28(A) y 28(B), una influencia positiva de la relación enzima sustrato sobre el grado de hidrólisis. Esto es debido a que con mayores relaciones de enzima sustrato, hay mayor concentración de enzima añadida a la mezcla a hidrolizar y por ende, hay más sitios activos disponibles para que los enlaces esterés del aceite semi-refinado de anchoveta puedan ser hidrolizados y no exista una saturación enzimática por sustrato.

#### **4.8.2 Efecto de la temperatura**

Se observó en la figura 28(A) y 28(C), una influencia negativa de la temperatura de reacción sobre el grado de hidrólisis (GH). Esto es debido a la termoestabilidad de la enzima donde se determinó que el rango de estabilidad térmica era de 35-45°C, por lo tanto, someter a la enzima a largos periodos de tiempo donde la temperatura sea mayor a 45 °C provocará la desnaturalización de la misma (Goswani, et al., 2012), así como lo menciona Carvalho, Patrícia de O. et. al., (2009) en su investigación con lipasas nativas de origen fúngico *R. javanicus* y *Solitum P.* donde reportan que si la temperatura de reacción es

mayor a 45 °C provocará un efecto negativo desnaturalizando la enzima y perdiendo su actividad rápidamente durante el proceso.

#### **4.8.3 Efecto del tiempo**

Se observó en las figuras 28(B) y 28(C) una influencia positiva del tiempo de reacción (t) sobre el grado de hidrólisis (GH), factor que determina que a mayor tiempo de contacto hay un incremento de hidrólisis de los enlaces ésteres y por ende mayor liberación de ácidos grasos aumentando así el %GH.

Este efecto del tiempo irá de la mano con la temperatura, así como se muestra 28(C) a mayor tiempo y menor temperatura se obtendrá mayor GH.

El aceite semi-refinado se sometió a hidrólisis mediante una lipasa comercial específica en las posiciones 1-3 de *Candida Cylindracea* para preservar los AGPI n-3 de cadena larga, que se encuentran preferentemente en la posición 2 de la columna vertebral del glicerol. Debido a las diversas insaturaciones cis-cis de PUFA, estas moléculas están fuertemente dobladas, mejorando así el efecto de impedimento estérico. Por lo tanto, los acilgliceroles que contienen AGPI apenas se divide por la lipasa, a diferencia de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados que fácilmente pueden ser liberados de la cadena por acción de la lipasa.

A partir del diseño experimental utilizando la lipasa aislada de AY AMANO 30SD, fue posible obtener un modelo de los parámetros de reacción en función del grado de Hidrólisis del aceite semi-refinado de anchoveta. Autores como Carvalho, et. al. (2009) informan que hidrólisis superiores a 50 horas podrían

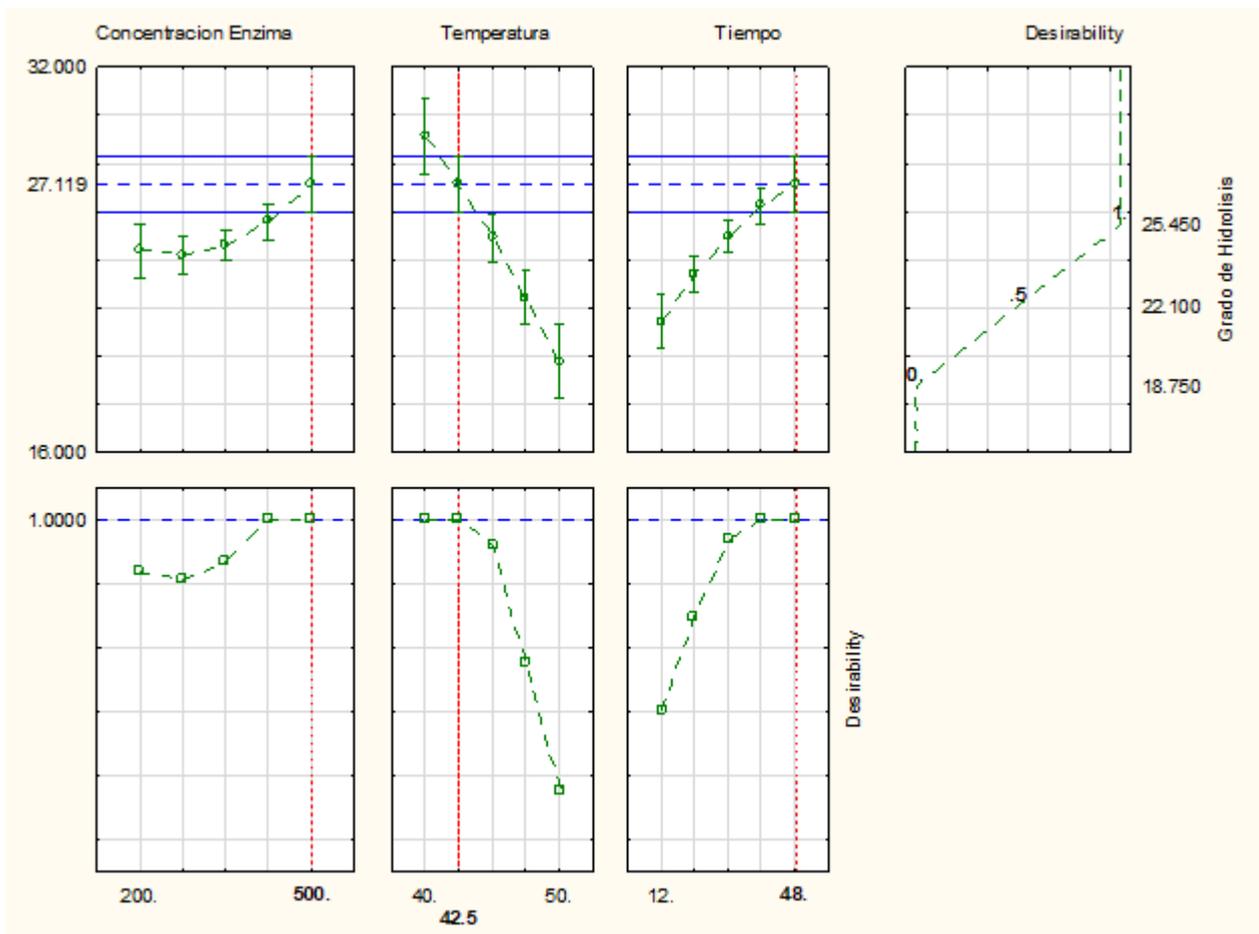
aumentar el porcentaje de GH% hasta en un 90%, en esta investigación la temperatura influyó significativamente en el proceso debido a que su rango termoestable se dio de 35-45 °C y se encontró que para maximizar el GH es en 42.5 °C, siendo este su punto óptimo de trabajo, ya que a temperaturas más altas provocan la desnaturalización y se traduce en la pérdida del poder catalítico Diestra Balta, et. al.(2015).

En este estudio se determinó una hidrólisis máxima de 26.119% después de 48 horas, lo que resultó en un aumento de 3.82% de AGPI n-3, significando que esta lipasa es útil para hidrólisis y concentración de aceite de pescado que con AGPI n-3 mayor al 30%.

#### **4.9 Optimización del proceso de Hidrólisis enzimática**

La optimización del proceso de hidrólisis de triacilglicéridos del aceite semi-refinado de anchoveta por acción de la enzima comercial AY AMANO 30SD, tuvo la finalidad de maximizar los valores de grado de hidrólisis. Para ello se hizo el análisis estadístico del perfil de deseabilidad, el cual se muestra en la figura 29.

En la primera columna de la figura 29, se observa que el mayor valor del grado de hidrólisis se obtiene para una concentración enzimática (E) de 500 U/mL. Al analizar la segunda columna de la figura 29, el punto con el mayor grado de hidrólisis se encuentra para una temperatura (T) de 42.5°C. En la tercera columna de la figura 29, se observa que el mayor valor del grado de hidrólisis se determina para un tiempo de reacción (t) de 48 horas.



**Figura 29. Perfil del valor de deseabilidad para maximizar el valor del grado de hidrólisis**

Por lo tanto, la siguiente combinación de las variables de reacción se sugiere una concentración enzimática de 500 U/mL, temperatura de 42.5°C y un tiempo de reacción de 48 horas., condiciones en que el grado de hidrólisis que se obtendrá será de 27.119%.

Para comprobar la validez de los resultados de maximización, se llevaron a cabo 3 corridas experimentales las cuales se detallan en la tabla 19, las cuales se trabajaron bajo condiciones óptimas: concentración enzimática de 500 U/mL, temperatura de 42.5°C y un tiempo de reacción de 48 horas, parámetros concuerdan con los de Carvalho, Patrícia de O. et. al., (2009) quienes obtuvieron 60 % de GH, trabajando con lipasas nativas *R. javanicus* y *Solitum P.*, la diferencia entre el % grado de hidrólisis obtenido en esta investigación puede deberse a la especificidad de las lipasas para las posiciones de los ácidos grasos poliinsaturados 1,3, dando como resultado un menor %GH.

**Tabla 19 . %GH teórico y experimental**

Factores		%GH Pred.	%GH Exp.
T (°C)	42.5		
E [U/ml]	500	27.119	26.910
t (horas)	48		

#### 4.10 Caracterización fisicoquímica de los ensayos del diseño experimental

Se seleccionó 8 ensayos con mayor grado de Hidrólisis para caracterizar fisicoquímicamente y determinar su composición de ácidos grasos luego de la hidrólisis.

**Tabla 20. Ensayos con mayor GH%**

N° Ensayo	Variables independientes						% Grado Hidrólisis
	Codificado			Real			
	[E]	t	T	[E]	t	T	
	U/mL	Horas	°C	U/mL	Horas	°C	
2	1	-1	-1	439	19	42	22.21
4	1	1	-1	439	41	42	22.19
6	1	-1	1	439	19	48	25.45
8	1	1	1	439	41	48	21.04
10	1.68	0	0	500	30	45	24.10
11	0	-1.68	0	350	12	45	24.13
14	0	0	1.68	350	30	50	22.37
15	0	0	0	350	30	45	22.11

Se determinaron los siguientes análisis fisicoquímicos en los 8 ensayos seleccionados acidez%, sólidos%, humedad%, índice de anisidina e índice de yodo, los cuales se detallan en la tabla 21. La acidez inicial de la muestra antes de la hidrólisis enzimática fue de 0.13% la cual, luego de los diferentes ensayos se elevó hasta  $53.82 \pm 0.58\%$  que fue la acidez más alta obtenida y que representa el contenido de ácidos grasos libres presentes en la muestra, producto de la hidrólisis catalizada por la enzima. Para el contenido de sólidos totales las muestras no contenían ya que se trata de un aceite semi-refinado. La humedad en las muestras variaron de  $0.12 \pm 0.01$  hasta  $0.23 \pm 0.02$  esta

variación se da por la técnica de separación agua:aceite que se usó, que fue mediante centrifugación.

El índice de Anisidina varió desde  $25.42 \pm 0.16$  (t=12 horas) hasta  $48.04 \pm 0.15$  (t=41 horas), esta diferencia se debe a la relación proporcional que existe entre las horas en las que se realizó cada ensayo, mientras más horas de hidrólisis se emplearon, hubo un mayor aumento en el índice de anisidina, lo cual este parámetro indica la medida de los productos de oxidación secundaria de los lípidos.

**Tabla 21. Análisis fisicoquímico de 8 ensayos experimentales**

N° Ensayo	Análisis Fisicoquímico				
	Acidez %	Sólidos %	Humedad %	Índice de Anisidina	Índice de Yodo
2	$47.44 \pm 0.18$	<0.01	$0.12 \pm 0.01$	$31.00 \pm 0.29$	$186.49 \pm 0.22$
4	$50.32 \pm 0.43$	<0.01	$0.18 \pm 0.01$	$47.62 \pm 0.38$	$188.40 \pm 0.20$
6	$47.40 \pm 0.31$	<0.01	$0.22 \pm 0.03$	$31.99 \pm 0.22$	$187.44 \pm 0.10$
8	$42.36 \pm 0.27$	<0.01	$0.15 \pm 0.02$	$48.04 \pm 0.15$	$185.50 \pm 0.21$
10	$53.82 \pm 0.58$	<0.01	$0.23 \pm 0.02$	$39.09 \pm 0.32$	$186.60 \pm 0.17$
11	$43.34 \pm 0.97$	<0.01	$0.21 \pm 0.02$	$25.42 \pm 0.16$	$188.48 \pm 0.18$
14	$40.73 \pm 0.50$	<0.01	$0.17 \pm 0.02$	$38.11 \pm 0.24$	$187.66 \pm 0.21$
15	$47.23 \pm 0.43$	<0.01	$0.20 \pm 0.01$	$35.30 \pm 0.19$	$188.22 \pm 0.13$

En la tabla 22 se detalla la composición de ácidos grasos de cada uno de los 8 ensayos seleccionados, de los cuales se puede observar de manera cuantitativa que hubo oxidación de los lípidos, al ser la muestra de aceite semi-refinado de alta composición de ácidos grasos poliinsaturados, son los que rápidamente sufren cambios y proporcionan de manera indirecta una medida de oxidación lipídica. (Sahidi, 2005)

**Tabla 22. Composición de ácidos grasos de los 8 ensayos experimentales**

Abreviatura	Nombre común del ácido graso	N° Ensayo							
		2	4	6	8	10	11	14	15
C14:0	Ácido mirístico	8.07	8.29	8.16	8.32	8.12	8.04	8.18	8.35
C16:0	Ácido palmítico	18.19	18.71	18.34	18.76	18.32	17.97	18.47	18.96
C18:0	Ácido esteárico	3.78	3.87	3.81	3.91	3.81	3.75	3.86	3.93
C20:0	Ácido araquídico	0	0	0	0	0	0	0	0
C22:0	Ácido behénico	0	0	0	0	0	0	0	0
C23:0	Acido Tricosanoico	0	0	0	0	0	0	0	0
C24:0	Acido Tetracosanoico	0.84	0.83	0.84	0.81	0.84	0.85	0.83	0.83
TOTAL AGS		30.88	31.7	31.15	31.8	31.09	30.61	31.34	32.07
C24:1	Ácido nervónico	0	0	0	0	0	0	0	0
C22:1	Ácido erúico	0.77	0.77	0.77	0.75	1.11	0.78	0.76	0.76
C20:1	Ácido gadoleico	0.87	0.8	0.89	0.9	0.89	0.87	0.88	0.81
C18:1 VAC	Ácido vaccénico	9.47	9.64	9.55	9.74	9.55	9.53	9.63	9.76
C18:1 OLE	Ácido oleico	3	3.07	3.04	3.1	3.03	3.02	3.06	3.1
C16:1	Ácido palmitoleico	8.15	7.99	8	8.06	7.93	7.89	7.91	8.01
C14:1	Ácido mirístoleico	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL AGM		22.26	22.27	22.25	22.55	22.51	22.09	22.24	22.44
C20:4 (n-6)	Ácido araquidónico	1.02	0.97	1	0.95	0	0.85	0.97	0
C20:2 (n-6)	Ácido eicosadenoico	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:2 (n-6)	Ácido linoleico	1.16	1.17	1.17	1.18	1.16	1.17	1.17	1.19
TOTAL AGP n-6		2.18	2.14	2.17	2.13	1.16	2.02	2.14	1.19
C20:3 (n-3)	Ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico	0	0	0	0	0	0	0	0
C18:3 (n-3)	Ácido $\gamma$ -linolénico	1.25	1.26	0.74	1.24	1.39	1.41	1.25	1.37
C22:6 DHA (n-3)	Ácido docosahexaenoico	11.31	11.06	11.21	10.72	11.14	11.37	11.01	10.98
C20:5 EPA (n-3)	Ácido eicosapentaenoico	18.47	18.2	18.4	17.73	18.31	18.6	18.15	18.1
TOTAL AGP n-3		31.03	30.52	30.35	29.69	30.84	31.38	30.41	30.45

La mayor variación del total AGP n-3 entre los ensayos fue del ensayo N°8, que se dio en 41 horas de hidrólisis como resultado una disminución de 2.05% en TOTAL AGP n-3, el mismo que tiene una anisidina de 92.04 por lo que se comprueba que a mayor tiempo de hidrólisis hay una disminución en el TOTAL AGP n-3, esto se debe a la autooxidación de los mismos. (Rodríguez, Villanueva, Glorio y Baquerizo, 2015).

Según los datos de la composición de ácidos grasos de la Tabla 23 se comprueba que no se llega a un nivel más alto de AGPI n-3, que el aceite inicialmente trabajado, por lo tanto, es necesario implementar un método de apoyo para concentrar los AGPI como lo dice Bonilla-Méndez & Hoyos-Concha, (2018).

**Tabla 23. Variación %AGP n—3 en los ensayos**

Abreviatura	N° Ensayo									
	0	2	4	6	8	10	11	14	15	
<b>C18:3 (n-3)</b>	1.26	1.25	1.26	0.74	1.24	1.39	1.41	1.25	1.37	
<b>C22:6 DHA (n-3)</b>	11.53	11.31	11.06	11.21	10.72	11.14	11.37	11.01	10.98	
<b>C20:5 EPA (n-3)</b>	18.95	18.47	18.2	18.4	17.73	18.31	18.6	18.15	18.1	
<b>TOTAL AGP n-3</b>	31.74	31.03	30.52	30.35	29.69	30.84	31.38	30.41	30.45	

#### 4.11 Concentración de ácidos grasos poliinsaturados

La concentración de AGPI n-3 se realizó mediante la hibernación de aceite, este método empleado fue de ayuda para separar los AGS formados durante la hidrólisis. La muestra sometida a esta concentración fue la que obtuvo mayor %GH, con los parámetros óptimos: Concentración de enzima 500 U/mL, temperatura de 42.5°C y un tiempo de reacción de 48 horas, donde se logró un %GH=26.91.

La muestra sometida para la concentración AGPI n-3, se procedió a realizar las 3 etapas de enfriamiento para lograr la cristalización y retención de los ácidos grasos saturados

mientras que los AGPI se obtendrán en forma líquida (oleína). (Vazquez & Akoh, 2012).

A continuación, se muestra la gráfica del aceite en hibernación el cual pasó por las tres etapas de enfriamiento, obteniendo así una muestra físicamente sólida y preparada para luego ser separada por presión con un medio filtrante.



**Figura 30. Aceite en hibernación**

Luego de la hibernación, teniendo ya la muestra sólida se procedió a realizar el filtrado mediante una malla de algodón y un disco filtrante de 0.45  $\mu\text{m}$  de Nylon, para retener los ácidos grasos saturados y obtener la oleína concentrada.



**Figura 31. Obtención de aceite concentrado**

Se realizó la caracterización fisicoquímica del AGPI n-3 concentrado en forma de acilglicérido, los resultados se muestran en la tabla 24.

**Tabla 24. Análisis fisicoquímico de Aceite concentrado de semi-refinado de Anchoveta**

<b>Análisis</b>	<b>Media <math>\pm</math> desviación estándar</b>
Acidez %	15.13 $\pm$ 0.070
Impurezas Sólidas %	<0.01
Humedad %	<0.50
Estearina %	<0.01
Índice de Anisidina	55.05 $\pm$ 0.43
Índice de Yodo	198.97 $\pm$ 0.14
Punto de fusión °C	18

Se pudo determinar el análisis fisicoquímico del aceite concentrado para identificar los parámetros que cambiaron luego del proceso de concentración, siendo así la disminución de la acidez% y aumento del índice de anisidina e índice de yodo. La reducción de la acidez% se debe a la eliminación de los ácidos grasos saturados (formados en la hidrólisis enzimática) (Rodríguez Arzave, Ruiz Loaiza, Santoyo Stephano y Miranda Velásquez, 2016) durante la filtración que le conferían al aceite la turbidez y alto punto de fusión. (Chan Moromisato, 2015)

El aumento del índice de anisidina se debe a la oxidación de los lípidos (formación de aldehídos) durante el tiempo de hidrólisis, siendo proporcional a mayor tiempo de contacto el agua con el aceite el valor de anisidina aumentará.

El aumento del índice de yodo se debe a la concentración de omega 3 en el aceite, y es directamente proporcional a las insaturaciones que este contiene, por lo tanto a más %AGPI, mayor será el índice de yodo. (Muniategui, Paseiro y Simal, 1992)

A continuación, se presenta la tabla N° 25, donde se detalla la composición de ácidos grasos del aceite concentrado y el aceite antes de concentrar para hallar su diferencia %.

**Tabla 25. Composición de ácidos grasos del aceite concentrado y el aceite antes de concentrar**

Abreviatura	Nombre común del ácido graso	Aceite antes de concentrar	Aceite concentrado
C14:0	Ácido mirístico	8.280±0.010	7.845±0.715
C16:0	Ácido palmítico	18.085±0.005	7.265±0.015
C18:0	Ácido esteárico	3.685±0.005	2.070±0.010
C20:0	Ácido araquídico	0.000±0.000	0.000±0.000
C22:0	Ácido behénico	0.000±0.000	0.505±0.005
C23:0	Acido Tricosanoico	0.000±0.000	0.000±0.000
C24:0	Acido Tetracosanoico	0.820±0.010	0.965±0.005
<b>TOTAL AGS</b>		<b>30.870±0.020</b>	<b>18.650±0.720</b>
C24:1	Ácido nervónico	0.000±0.000	0.000±0.000
C22:1	Ácido erúxico	0.000±0.000	0.000±0.000
C20:1	Ácido gadoleico	0.730±0.010	1.155±0.045
C18:1 VAC	Ácido vaccénico	9.085±0.005	11.805±0.005
C18:1 OLE	Ácido oleico	2.915±0.007	3.735±0.005
C16:1	Ácido palmitoleico	8.100±0.010	10.150±0.010
C14:1	Ácido mirístoleico	0.000±0.000	0.000±0.000
<b>TOTAL AGM</b>		<b>20.830±0.03</b>	<b>26.845±0.035</b>
C20:4 (n-6)	Ácido araquidónico	1.010±0.010	1.110±0.010
C20:2 (n-6)	Ácido eicosadenoico	0.000±0.000	0.000±0.000
C18:2 (n-6)	Ácido linoleico	1.150±0.010	1.445±0.005
<b>TOTAL AGP n-6</b>		<b>2.160±0.020</b>	<b>2.555±0.005</b>
C20:3 (n-3)	Ácido dihomo- $\gamma$ - linolénico	0.000±0.000	0.000±0.000
C18:3 (n-3)	Ácido $\gamma$ -linolénico	1.245±0.015	1.375±0.005
C22:6 DHA (n-3)	Ácido docosahexaenoico	11.525±0.005	12.530±0.030
C20:5 EPA (n-3)	Ácido eicosapentaenoico	18.965±0.015	20.935±0.015
<b>TOTAL AGP n-3</b>		<b>31.735±0.005</b>	<b>34.840±0.020</b>
<b>Ácidos no identificados</b>		<b>14.405±0.075</b>	<b>17.110±0.770</b>
<b>TOTAL DE ACIDOS GRASOS</b>		<b>100.000±0.000</b>	<b>100.000±0.000</b>

El aceite concentrado obtenido después de la hibernación se le realizó un análisis de ácidos grasos donde mostró un aumento de la cantidad AGPI n-3 en 3.105% y

disminuyó en 12.22% la cantidad de AGS (ácidos grasos saturados), esto se debe a la separación por hibernación y puntos de fusión en la que se extrajo la parte oleica mediante la aplicación de una curva de enfriamiento, esta técnica ha sido desarrollada principalmente para concentrar AGPI n-3 a partir de triacilgliceroles de forma natural.

De esta forma los valores obtenidos para el incremento de AGPI n-3 por medio de hibernación son comparables con los de Cunha, D. et. al. (2009), donde reportan un incremento de 9.2% de AGPI n-3 y una disminución de 13.3% de AGS. Los porcentajes de aumento van a variar en función del método físico de separación a aplicar (Bonilla-Méndez & Hoyos-Concha, 2018) y el solvente como refuerzo para formar cristales la cristalización de AGS y permitir una mejor filtración.

Por lo tanto en esta investigación se pudo comprobar que se puede lograr un aumento de AGPI n-3 en aceite semi-refinado de anchoveta (*Engraulis ringens*) mediante hidrólisis enzimática con ayuda de un método de concentración Hibernación por medio de puntos de fusión con la finalidad de obtener un incremento de 3.105% de AGPI n-3, demostrando que es viable aplicar la hidrólisis como alternativa para obtener AGPI n-3 concentrado en forma de acilglicéridos naturales de mayor capacidad de absorción y biodisponibilidad en comparación a los derivados sintéticos como el ester etílico.

## V. CONCLUSIONES

1. Se determinó la actividad enzimática para la enzima comercial AY AMANO 30 SD resultando  $37\ 384.55\ \text{U/mL} \pm 395.07$  y los parámetros cinéticos de la lipasa  $K_m=7.98\ \text{g/L}$  y un  $V_{\text{máx.}} = 0.038887\ \text{g/L} \times \text{min}$
2. Se comprobó mediante el efecto de la temperatura, que la actividad relativa al 100% se obtuvo a la temperatura de  $50^\circ\text{C}$  como lo establece la ficha técnica del fabricante.
3. Se halló el rango de termoestabilidad para la lipasa AY AMANO 30 SD de  $35\text{-}45^\circ\text{C}$  concordando así con los demás autores que trabajaron con enzimas de origen fúngico.
4. Se determinaron los parámetros cinéticos de inactivación térmica para las temperaturas de  $40, 50, 60, 70$  y  $80\ ^\circ\text{C}$ ,  $K_d$  ( $0.0031, 0.0051, 0.0280, 0.0427$  y  $0.04875$ ) y  $t_{1/2}=(219.91\ \text{min}, 135.41\ \text{min}, 24.74\ \text{min}, 16.22\ \text{min}$  y  $14.22\ \text{min})$  respectivamente.
5. La caracterización fisicoquímica del aceite semi-refinado de anchoveta que se obtuvo, se encontró dentro de los parámetros reportados por diversos autores y por las normas técnicas peruanas dando como resultado los siguientes:  $\text{Acidez}\% = 0.130 \pm 0.020$ ,  $\text{Impurezas sólidas}\% = <0.01$ ,  $\text{Humedad}\% = 0.017 \pm 0.004$ ,  $\text{Esterina}\% = <0.01$ ,  $\text{Índice de Anisidina} = 11.29 \pm 0.318$ ,  $\text{Índice de Yodo} = 194.27 \pm 0.569$ .
6. Se logró el mayor grado hidrólisis enzimática de aceite semi-refinado de anchoveta usando la enzima AY AMANO 30 SD a nivel experimental, con parámetros óptimos de Concentración de enzima  $500\ \text{U/g}$ , temperatura  $42.5\ ^\circ\text{C}$  y tiempo de 48 horas, obteniéndose  $26.910\ \text{GH}\%$ .
7. La concentración de AGPI, se logró luego de aplicar el método de concentración de hibernación al aceite semi-refinado de anchoveta hidrolizado en los parámetros óptimos, alcanzando un aumento de  $3.105\%$  en AGPI n-3.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar otras lipasas comerciales para la obtención de un aceite altamente concentrado en omega-3 (EPA Y DHA).
2. Realizar una hidrólisis enzimática con ausencia de oxígeno y evaluar los parámetros de calidad en función de la anisidina y los tiempos de hidrólisis.
3. Investigar sobre la aplicabilidad del aceite concentrado obtenido por hidrólisis enzimática e hibernación para el enriquecimiento de productos alimenticios o para el consumo humano en jarabe o cápsulas blandas.
4. Aplicar otro tipo de método de separación de los AGS (ácidos grasos saturados) del aceite hidrolizado para mejorar la separación para obtener altos niveles de AGPI n-3.
5. Realizar un análisis técnico económico para demostrar la rentabilidad del método de hidrólisis frente a otros métodos de concentración de AGPI n-3 en aceite de anchoveta.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akabas, S., & Deckelbaum, R. (2006). N-3 fatty acids: recommendations for therapeutic and prevention. *Am J Clin Nutr*, 1451-1462.
- Al-Hamamre, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kröger, M., & Kaltschmitt, M. (2012). Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*, 96, 70-76.
- AMANO ENZYME. (2020). Technical Data Sheet Lipase AY "Amano" 30SD.
- AOCS, A. O. (2009). *Free Fatty Acid*. Urbana: AOCS.
- AOCS, A. O. (2009). *Moisture an Volatile Matter Hot Plate Method*. Urbana:AOCS.
- Arterburn, L., Bailey, E., & Oken, H. (2006). Distribution, in-terconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am Jclin Nutr*, 1467-1476.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos*. México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Bailey, A. E. (2005). *Aceites y grasas industriales*. Buenos Aires: Reverte Argetina S.C.A.
- Bailey, E. (1961). *Aceites y grasas industriales*. Tennessee: Reverte.
- Bernardini, E. (1991). TECNOLOGÍA DE ACEITES Y GRASAS. *Alhambra*.
- Bhandari, K., Chaurasia, P., & Singh, K. (2017). Kinetics of enzymatic hydrolysis of Indian tuna fish oil using *Candida rugosa* lipase. *Science Direct*, 413-418.
- Bimbo, A. (1999). Pautas para la clasificación del aceite de pescado comestible. *Aceites y Grasas* , 410-421.
- Bonilla-Méndez, J. R., & Hoyos-Concha, J. L. (2018). Methods of extraction, refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 645-668.
- Boran, G., Karacam, H., & Boran, M. (2006). Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. *Food Chemistry*, 693-698.
- Brooks, D. D., Berbesi, R., & Hodgson, A. S. (2013). *Optimization bleaching process*.

- Cachago Chávez, I. B. (2015). Estudio de hidrólisis en aceite de coco virgen (*Cocos nucifera*) mediante el uso de lipasas inmovilizadas aplicando el diseño de superficie de respuesta. (Tesis de Pregrado), Ecuador.
- Camacho Tarsis, C. C. (2014). DIFERENTES MÉTODOS PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN HIDROLASAS DE IMPORTANCIA COMERCIAL. Ambato, Ecuador.
- Campos Grijalva, A. (2017). *Optimización de la temperatura de secado y presión de vacío en la decoloración del aceite crudo de pescado*. (Tesis de Pregrado), Nuevo Chimbote.
- Carrizo, J. (1999). El aceite de pescado: sus propiedades. *Aceites y Grasas*, 407-408.
- Carvalho, Patrícia de O, Campos, Paula R. B., D'Addio Noffs, Maximiliano, Fregolente, Patricia B. L., & Fregolente, Leonardo V. (2009). Enzymatic Hydrolysis of Salmon Oil by Native Lipases: Optimization of Process Parameters. *Sociedade Brasileira de Química*, 117-124.
- Castellanos T., Lyssia, & Rodriguez D., Mauricio. (2015). El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. *Revista chilena de nutrición*, 90-95.
- Castro-González, M. I. (2002). Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia*, 128-136.
- Chan Moromisato, J. P. (2015). *EFICACIA ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*) EN LA ESTABILIDAD DEL ACEITE DE LINAZA (*Linum usitatissimum* L.)*. LIMA.
- Charanyaa, S., Belur, P., & Regupathi, I. (2017). A new strategy to refine crude indian sardine oil. *J. Oleo*, 425-434.
- Coca, Janny, Hernandez, Odette, Berrio, Rachel, Martínez, Sonia, Díaz, Ernesto, & Dustet, Julio C. (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotecnología Aplicada*, 216-220.
- Codex Alimentarius. (2015). Norma del codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. *Codex Stan 19-1981*, 1-5.
- Colpex. (2019). *Manual de refinación de aceite de pescado*. Lima.

- Cunha, D. C., Crexi, V. T., & De Almeida-Pinto, L. A. (2009). Winterization of fish oil with solvent. *Food Science and Technology*, 207-213.
- Czaplicki, S. (2013). Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatography*.
- Diestra Balta, J., Margarito Aguilar, L., Vega Paulino, R., & Castillo Calderón, A. (2015). Modelación matemática del efecto de la temperatura en la actividad y la estabilidad térmica de la inulinasa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Scientia Agropecuaria*, 303-312.
- Dobrev, G., Zhekova, B., Nedelcheva, P., Chochkov, R., & Krastanov, A. (2011). Characterization of Crude Lipase from *Rhizopus Arrhizus* and Purification of Multiplicity Forms of the enzyme. *Biotechnology & Biotechnological*, 2295-2300.
- Escorcía, A., Cruz, J., Torres, R., & Ortiz, C. (2011). RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (R,S)-MANDELATO DE METILO POR PREPARACIONES INMOVILIZADAS DE LIPASA DE *Candida antarctica* B. *Vitae*, 33-41.
- Etienne Deffense. (2020). Chemical Degumming. *Crystallisation & Degumming S.P.R.L.*
- FAO. (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. *Estudio FAO Alimentación y Nutrición*, 1-169.
- Fernández-Jerí, Yadira, Zavaleta, Amparo I., Paredes, Luis A., & Izaguirre, Victor. (2013). CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA LIPASA EXTRACELULAR DE *Marinobacter* sp. EMPLEANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE RESPUESTA. *Ciencia e Investigación*, 12-17.
- Gentili, A., Curini, R., Cernia, E., & D'Ascenzo, G. (1996). Thermal stability and activity of *Candida cylindracea* lipase. 43-49.
- Ghazani, S., & Marangoni, A. (2013). Minor Components in Canola Oil and Effects of Refining on These Constituents: A Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.
- Gong, Y., Wan, X., Jiang, M., Hu, H., & Huang, F. (2014). Metabolic engineering of microorganisms to produce omega-3 very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 19-35.

- González-Tovar, L., Noriega-Rodriguez, J. A., Ortega-García, J., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. A. (2005). Cinética de adsorción de pigmentos, peróxidos y tocoferoles durante el proceso de blanqueo del aceite de soja. *Grasas y Aceites*, 324-327.
- Goswami, D., De, S., & Basu, J. (2012). Effects of Process Variables and Additives on Mustard Oil Hydrolysis by Porcine Pancreas Lipase. *Brazilian Journal of Chemical Engin*, 449-460.
- Group Camar Peru SAC. (2019). Manual HACCP de la planta de Semi-refinado de aceite. *Versión 01*.
- Gupta, M. K. (2017). *ractical Guide to Vegetable Oil Processing (Second Edition)*. *Encyclopedia of Food Chemistry*.
- Gutierrez, J. B. (2000). *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Madrid, España: Díaz de Santos S.A.
- Hosseini, H., Ghorbani, M., Madhi Jafari, S., & Sadeghi Alireza, M. (2018). Investigating the effect of lipase from *Candida rugosa* on the production of EPA and DHA concentrates from Kilka fish (*Clupeonella cultiventris caspia*). *LWT-Food Science and Technology (2018)*.
- Ixtaina, V. (2010). *Caracterización de la semilla y el aceite de chía (Salvia Hispánica L.) obtenido mediante distintos procesos y aplicación en tecnología de alimentos*. Buenos Aires.
- Kahveci, D., & Xu, X. (2011). Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Science Direct*, 1552-1558.
- Kashiwagi, S., & Huang, P. L. (2012). Dietary Supplements and Cardiovascular Disease: What is the Evidence and What Should We Recommend? *Cardiovascular Risk Factors*.
- Lascano Demera, L. D. (2018). *Producción, extracción y caracterización de lipasas provenientes de la levadura antártica Guehomyces pullulans*. (Tesis de Pregrado), Quito.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of American Chemical Society*, 56, 568.

- Lopez, H. (2018). Omega-3 en forma de triglicérido natural versus ester etílico sintético. *Nordic Naturals*. Obtenido de <https://www.nordicnaturals.com/>
- Magallanes, L. M., Tarditto, L. V., Grosso, N. R., Pramparo, M. C., & María, F.G. (2019). Highly concentrated omega-3 fatty acid ethyl esters by urea complexation and molecular distillation. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 877-884.
- Mataix, J., & Gil, A. (2004). *Libro Blanco de los Omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados Omega 3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud* (1° edición ed.). España: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Maza Ramírez, S., Aldoradin Puza, E., Pariona Velarde, C., Arpi Anco, E., & Rosales-Hartshorn, M. (2016). Efecto del desollado y desangrado de anchoveta (*Engraulis ringens*) en solución de citrato sódico. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(3), 427-439. doi:<https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i3.12010>
- Mohd Hussin, F. N., Attan, N., & Wahab, R. A. (2020). Taguchi design-assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto a ternary alginate/nanocellulose/montmorillonite composite: Physicochemical characterization, thermal stability and reusability studies. *Enzyme and Microbial Technology*, 109506.
- Muniategui, S., Paseiro, P., & Simal, J. (1992). Medida del grado de insaturación de aceites y grasas comestibles por espectroscopia infrarroja y su relación con el índice de yodo. *Grasas y Aceites*, 1-5.
- Navas, P. (2010). *Componentes minoritarios y propiedades antioxidantes de aceites vírgenes y tortas residuales obtenidos por presión en trio a partir de fuentes vegetales convencionales y no convencionales*. Ciudad Real, España. .
- Nielsen, S. (2009). *Análisis de Alimentos*. Madrid: Acribia.
- Okada, T., & Morrissey, M. (2007). *Food Chem.* 1411.
- Piñeiro-Corrales, G., Lago Rivero, N., & Culebras-Fernández, J. M. (2013). Papel de los ácidos grasos omega-3 en la prevención de enfermedades cardiovasculares. *Nutrición Hospitalaria*, 1-5.
- Regla, I., Vázquez Vélez, E., Cuervo Amaya, D., & Cristobal, N. A. (2014). La química del jabón y algunas aplicaciones. *Revista Digital Universitaria*.

- Rivas González, R. (2015). *Aplicaciones farmacéuticas de las lipasas microbianas*. Obtenido de [https://gedos.usal.es/bitstream/handle/10366/127824/TG\\_GarciaEstebanS\\_Lipasasmicrobianas.pdf;jsessionid=DCBA5077D71716CD04A07521B19573CE?sequence=1](https://gedos.usal.es/bitstream/handle/10366/127824/TG_GarciaEstebanS_Lipasasmicrobianas.pdf;jsessionid=DCBA5077D71716CD04A07521B19573CE?sequence=1)
- Robalino, J. J. (2009). *Aprovechamiento de Residuos Pesqueros para la Obtención de Ácidos grasos omega 3 en el procesamiento de productos alimenticios*. (tesis de pregrado) Escuela Superior Politécnico del Litoral, Ecuador.
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications . *Essays Biochem* , 1-41.
- Rodríguez Arzave, J. A, Ruiz Loaiza, L., Santoyo Stephano, M. A., & Miranda Velásquez, L. G. (2016). DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ Y ACIDEZ TOTAL DE CINCO MAYONESAS. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 843-849.
- Rodríguez, G., Villanueva, E., Glorio, P., & Baquerizo, M. (2015). Oxidative stability and estimate of the shelf life of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Scientia Agropecuaria*, 155-163.
- Rodríguez, M., & Lemma, A. (2005). *Planeamiento de experimentos y optimización de procesos*. Brasil: Casa do Pao.
- Roldán Acero, D. (2016). Extracción y refinación de aceite de pescado. *Articulo de clase*.
- Salas, A., Ayala, M. E., & Albrecht, M. (2003). Contenido de EPA y DHA en aceite crudo de pescado producido en el Perú durante el periodo 1996-2000. *Instituto Tecnológico Pesquero del Perú*.
- Salimon, J., Mudhaffar Abdullah, B., & Salih, N. (2011). Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from *Jatropha curcas* seed oil. *Chemistry Central Journal*, 2-9.
- Serpa G., A. M., Echeverri L., A., Lezcano C., M. P., Vélez A., L. M., Ríos, A. F., & Hincapié, G. A. (2014). EXTRACCIÓN DE ACEITE DE AGUACATE VARIEDAD “Hass” (*Persea americana* Mill) LIOFILIZADO POR PRENSADO EN FRIO. *Revista Investigaciones Aplicadas* , 113-123.

- Sharma, A., Chaurasia, S. P., & Dalai, A. K. (2013). Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Catalysis Today*, 93-100.
- Silva, S. M., Sampaio, K. A., Ceriani, R., Verhé, R., Stevens, C., Greyt, W. d., & Meirelles, A. J. (2014). Effect of type of bleaching earth on the final color of refined palm oil. *LWT - Food Science and Technology*, 1258-1264.
- Skoog, D. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid: Mc Graw Hill.
- Stoker, S., & Walker, E. (1991). *Fundamentos de química general, orgánica y biológica*. Boston: Allyn and Bacon.
- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Adv Nutr*, 1-7.
- Tena, N., Lobo-Prieto, A., Aparicio, R., & García-González, D. L. (2018). Storage and Preservation of Fats and Oils. *Reference Module in Food Science*. doi:doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.22268-3
- Torres González, O., Angulo Guerrero, R., Oliart Ros, R., & Medina Juárez, L. (2009). *Efecto de la refinación física sobre la calidad química y sensorial del aceite de coco*. México.
- Torres-Sáez, R. G. (2014). Modificación Química en Fase Sólida de Lipasa B de Candida antarctica para mejorar sus propiedades de actividad, estabilidad y enantioselectividad. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 181-204.
- Valenzuela B, R., Morales I, G., González A, M., Morales P, J., Sanhueza C, J., & Valenzuela B, A. (2014). Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga  $\omega$ -3 y enfermedad cardiovascular. *Revista chilena de nutrición*, 319-327.
- Valenzuela B, R., Morales P, J., Sanhueza C, J., & Valenzuela B, A. (2013). Docosahexaenoic acid (DHA), an essential fatty acid at the brain. *Revista chilena de nutrición*, 383-390.
- Valenzuela B., A., & Valenzuela B., R. (2014). Ácidos grasos omega-3 en la nutrición ¿cómo aportarlos? *Revista chilena de nutrición*, 205-211.
- Valenzuela, A. (2012). Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos.

- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & Nieto, S. (2006). Docosahexaenoic acid (DHA), essentiality and requeriments: Why and how to provide supplementation. *Grasas Aceites*, 229-237.
- Vázquez, J. A., Nogueira, M., Durán, A., Prieto, M. A., Rodríguez-Amado, I., Rial, D., . . . Murado, M. (2011). Preparation of marine silage of swordfish, ray and shark visceral waste by lactic acid bacteria. *Journal of Food Engineering*, 103(4), 442-448.
- Vazquez, L., & Akoh, C. C. (2012). Enrichment of stearidonic acid in modified soybean oil by low temperature crystallisation. *Food Chemistry*, 147-155.
- Wade, L. (2004). *Química Orgánica*. Madrid, España: Pearson Education S.A.
- Wanasundara, U., & Shahidi, F. (1998). Concentration of  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Oils Using *Candida cylindracea* Lipase: Optimization of Reaction Conditions. *Science Direct*, 1768-1774.
- Wanasundara, U., & Shahidi, F. (1998). Lipase-Assisted Concentration of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Acylglycerols from Marine Oils. *Science Direct*, 945-951.
- Yıldız, M., Eroldoğan, T. O., Ofori-Mensah, S., Engin, K., & Baltacı, M. A. (2018). The effects of fish oil replacement by vegetable oils on growth performance and fatty acid profile of rainbow trout: Re-feeding with fish oil finishing diet improved the fatty acid composition. *Aquaculture*, 488, 123-133.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.030>

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Determinación del rango de linealidad y actividad lipídica de la enzima AY AMANO 30 SD

**Tabla 26. Experiencias para la determinación de la actividad enzimática a diferentes diluciones enzimáticas**

N°	TIEMPO REACCION	mL NaOH (blanco)	DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 1:6000		DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 1:7000		DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMATICA 1:8000	
			mL NaOH (muestra)	umol ac. graso / mL muestra	mL NaOH (muestra)	umol ac. graso / mL muestra	mL NaOH (muestra)	umol ac. graso / mL muestra
1	0	0.30	0.30	0.000	0.30	0.000	0.30	0.000
2	5	0.30	0.48	0.450	0.40	0.250	0.37	0.175
3	10	0.30	0.54	0.600	0.52	0.550	0.49	0.475
4	15	0.30	0.68	0.950	0.65	0.875	0.60	0.750
5	20	0.30	0.82	1.300	0.79	1.225	0.72	1.050
6	25	0.30	0.95	1.625	0.89	1.475	0.82	1.300
7	30	0.30	1.12	2.050	0.98	1.700	0.87	1.425
8	35	0.30	1.20	2.250	1.09	1.975	0.92	1.550
9	40	0.30	1.29	2.475	1.16	2.150	0.95	1.625
10	45	0.30	1.39	2.725	1.20	2.250	0.98	1.700

El método común usado para determinar la actividad de las lipasas mide los ácidos carboxílicos libres o residuos de ácidos grasos generados durante la hidrólisis de los sustratos por titulación. El rango de linealidad se determinó de manera gráfica a diferentes diluciones de enzima, sacando una muestra representativa de 10 mL cada 5 minutos y procediendo a titular los ácidos grasos liberados para hallar la velocidad de liberación de umol de ácidos grasos por minuto.

$$\text{Actividad Lipídica } \left(\frac{\text{UI}}{\text{g}}\right) = \frac{\text{pendiente} \times 1000}{\text{Vol.muestra} \times \text{dilución}}$$

Donde:

Volumen de muestra= 20 (muestra + solución de inactivación)

Dilución = 1/6000, 1/7000 y 1/8000

Pendiente= pendiente de cada curva lineal 1:6000, 1:7000 y 1:8000

**Tabla 27. Determinación de actividad enzimática para cada dilución**

Dilución enzimática	Tiempo (min)	Pendiente lineal	Actividad enzimática (UI/g)
1:6000	35	0.0647	36972.79
1:7000	30	0.0588	37420.38
1:8000	25	0.0537	37760.48

## ANEXO 2: Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax

**Tabla 28. Experiencias para la determinación de parámetros cinéticos**

N°	[So] g/L	ENZIMA (1:7000) (mL)	EMULSION 50% (mL)	BUFFER (mL)	DENSIDAD (g/mL)	NaOH (mL muestra)	NaOH (mL blanco)	umol ac. graso / mL muestra	g acido / g muestra
1	137.40	5.00	6.00	39.0	1.0056	1.75	0.95	4.0000	0.0000381
2	160.30	5.00	15.00	30.0	0.9885	1.90	1.10	4.0000	0.0000383
3	183.20	5.00	17.50	27.5	0.9838	1.95	1.15	4.0000	0.0000385
4	206.10	5.00	20.00	25.0	0.9790	2.05	1.25	4.0000	0.0000387
5	229.00	5.00	22.50	22.5	0.9743	2.05	1.25	4.0000	0.0000388
6	251.90	5.00	25.00	20.0	0.9695	2.05	1.25	4.0000	0.0000390

Fórmula para determinar:

$$\frac{g \text{ ácido graso}}{g \text{ muestra}} = \frac{\text{Indice de Acidez} \times (282.4 \times 10^{-6})}{20 \times \rho}$$

Donde:

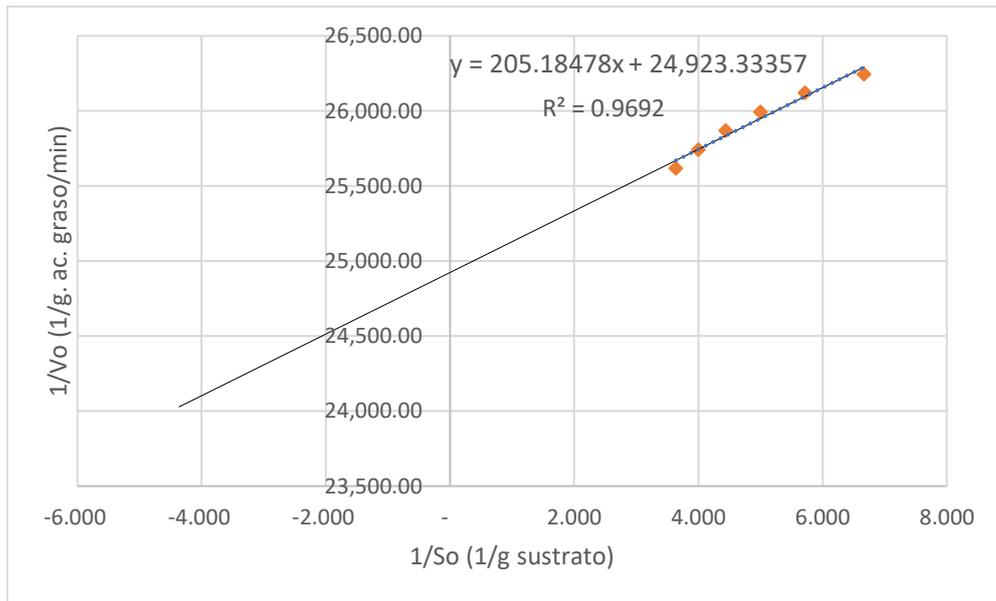
$\rho$  = densidad del aceite

282,47 g/mol = peso molecular del ácido oleico

20 = Tiempo de reacción en minutos

**Tabla 29. Inversa del sustrato vs. Inversa de la velocidad inicial**

[So]g/g	Vo (g/g)	1/So	1/V
0.150	0.0000381	6.667	26,246.15
0.175	0.0000383	5.714	26,120.03
0.200	0.0000385	5.000	25,993.91
0.225	0.0000387	4.444	25,867.79
0.250	0.0000388	4.000	25,741.67
0.275	0.0000390	3.636	25,615.55
0.150	0.0000381	6.667	26,246.15
0.175	0.0000383	5.714	26,120.03



**Figura 32. Representación gráfica de Lineweaver-Burk para emulsión y enzima AY AMANO 30 SD**

La ecuación del modelo ajustado:

$$\left(\frac{1}{V_o}\right) = 205.18478 \left(\frac{1}{S_o}\right) + 24923.33357$$

$$V_m = 0.038887 \frac{g}{L \cdot \text{min}}$$

$$K_m = 7.98 \frac{g}{L}$$

**Tabla 30.Efecto de la temperatura para hallar la actividad**

N°	TEMPERATURA (°C)	[So] %	ENZIMA (1:7000) (mL)	EMULSION 50% (mL)	BUFFER (mL)	densidad	mL NaOH (muestra)	mL NaOH (blanco)	umol ac. graso / mL muestra	g acido / g muestra
1	35	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.2	1.2	2.5000	0.0000355
2		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.2	1.2	2.5000	0.0000355
3		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.2	1.2	2.5000	0.0000355
4	40	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.6	1.2	3.5000	0.0000498
5		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.6	1.2	3.5000	0.0000498
6		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.55	1.2	3.3750	0.0000480
7	45	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.8	1.2	4.0000	0.0000569
8		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.85	1.2	4.1250	0.0000587
9		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.95	1.2	4.3750	0.0000622
10	50	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.85	1.2	4.1250	0.0000587
11		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.9	1.2	4.2500	0.0000604
12		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.95	1.2	4.3750	0.0000622
13	55	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.7	1.2	3.7500	0.0000533
14		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.6	1.2	3.5000	0.0000498
15		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.7	1.2	3.7500	0.0000533
16	60	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.2	1.2	2.5000	0.0000355
17		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.1	1.2	2.2500	0.0000320
18		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.1	1.2	2.2500	0.0000320
19	70	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.6	1.2	1.0000	0.0000142
20		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.6	1.2	1.0000	0.0000142
21		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.6	1.2	1.0000	0.0000142
22	80	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.2	1.2	0.0000	0.0000000
23		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.3	1.2	0.2500	0.0000036
24		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.3	1.2	0.2500	0.0000036

**Tabla 31. Estabilidad térmica**

N°	TEMPERATURA (°C)	[So] %	ENZIMA (1:7000) (mL)	EMULSION 50% (mL)	BUFFER (mL)	densidad	mL NaOH (muestra)	mL NaOH (blanco)	umol ac. graso / mL muestra	PROMEDIO	ACTIVIDAD	ACTIVIDAD INICIAL	ACTIVIDAD RESIDUAL
											umol ac. graso / mL * min	umol ac. graso / mL * min	umol ac. graso / mL * min
1	35	12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	3.10	1.35	2.188	2.438	0.0813	0.083	97.50%
2		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	3.50	1.35	2.688				
3		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	3.30	1.35	2.438				
4	40	12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	3.80	1.25	3.188	3.313	0.1104	0.115	95.80%
5		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	3.90	1.25	3.313				
6		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	4.00	1.25	3.438				
7	45	12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	4.50	1.35	3.938	3.729	0.1243	0.139	89.50%
8		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	4.00	1.35	3.313				
9		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	4.50	1.35	3.938				
10	50	12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	3.10	1.30	2.250	2.354	0.0785	0.142	55.40%
11		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	3.25	1.30	2.438				
12		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	3.20	1.30	2.375				
13	55	12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	2.30	1.35	1.188	1.167	0.0389	0.122	31.80%
14		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	2.35	1.35	1.250				
15		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	2.20	1.35	1.063				
16	60	12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.60	1.35	0.313	0.229	0.0076	0.078	9.80%
17		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.50	1.35	0.188				
18		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.50	1.35	0.188				
19	70	12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.35	1.35	0.000	0.042	0.0014	0.033	4.20%
20		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.40	1.35	0.063				
21		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.40	1.35	0.063				
22	80	12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.35	1.35	0.000	0.004	0.0001	0.006	2.50%
23		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.35	1.35	0.000				
24		12.50	5.00	12.50	32.50	0.9933	1.36	1.35	0.013				

**Tabla 32. Inactivación Térmica**

N°	TEMPERATURA (°C)	[So] %	ENZIMA (1:7000) (mL)	EMULSION 50% (mL)	BUFFER (mL)	densidad	mL NaOH (muestra)	mL NaOH (blanco)	umol ac. graso / mL muestra	ACTIVIDAD	ACTIVIDAD INICIAL	ACTIVIDAD RESIDUAL
										umol ac. graso / mL * min	umol ac. graso / mL * min	umol ac. graso / mL * min
1	60	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.07	0.9	0.2125	21.2500	38.839	54.7%
2		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.13	0.9	0.2875	0.0575	0.137	41.8%
3		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.18	0.9	0.3500	0.0350	0.099	35.5%
4		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.23	0.9	0.4125	0.0275	0.086	32.1%
5		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.26	0.9	0.4500	0.0225	0.079	28.4%
6		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.28	0.9	0.4750	0.0190	0.075	25.2%
7		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.29	0.9	0.4875	0.0163	0.073	22.3%
8	70	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.07	0.9	0.2125	21.2500	38.839	54.7%
9		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.10	0.9	0.2500	0.0500	0.137	36.4%
10		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.13	0.9	0.2875	0.0288	0.099	29.1%
11		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.14	0.9	0.3000	0.0200	0.086	23.3%
12		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.15	0.9	0.3125	0.0156	0.079	19.7%
13		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.15	0.9	0.3125	0.0125	0.075	16.6%
14		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.15	0.9	0.3125	0.0104	0.073	14.3%
15	80	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.07	0.9	0.2125	21.2500	38.839	54.7%
16		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.08	0.9	0.2250	0.0450	0.137	32.7%
17		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.10	0.9	0.2500	0.0250	0.099	25.3%
18		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.10	0.9	0.2500	0.0167	0.086	19.4%
19		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.10	0.9	0.2500	0.0125	0.079	15.8%
20		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.10	0.9	0.2500	0.0100	0.075	13.3%
21		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.11	0.9	0.2625	0.0088	0.073	12.0%

22	SIN CALENTAR	12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.21	0.9	0.3884	38.8393		
23		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.45	0.9	0.6875	0.1375		
24		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.69	0.9	0.9866	0.0987		
25		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	1.93	0.9	1.2857	0.0857		
26		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.17	0.9	1.5848	0.0792		
27		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.41	0.9	1.8839	0.0754		
28		12.5	5	12.5	32.5	0.9933	2.65	0.9	2.1830	0.0728		

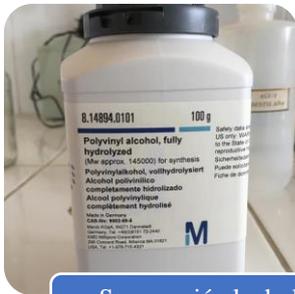
**Tabla 33. Datos para hallar los parámetros de inactivación térmica gráficamente**

<b>Tiempo</b>	<b>Ln (A final/A inicial)</b>	<b>Pendiente (m)</b>	<b>Intersección (Y)</b>	<b>K<sub>d</sub></b>	<b>t<sub>½</sub> (min)</b>
0	4.002095748	-0.0031518	4.0036921	0.0031518	219.92
5	3.999036201				
10	3.974298692				
15	3.942123398				
20	3.937061562				
25	3.920520189				
30	3.919766546				
0	4.002095748	-0.0051185	3.9976235	0.0051185	135.42
5	3.965134649				
10	3.95020114				
15	3.923075203				
20	3.889808678				
25	3.866452967				
30	3.849148979				
0	4.0020957	-0.0280205	3.9134735	0.0280205	24.74
5	3.733333				
10	3.5688336				
15	3.468339				
20	3.3461932				
25	3.227373				
30	3.1059914				

0	4.0020957				
5	3.5935711				
10	3.3721233				
15	3.1498853	-0.042734	3.8651806	0.042734	16.22
20	2.9815501				
25	2.8086627				
30	2.6613056				
0	4.0020957				
5	3.4882106				
10	3.2323613				
15	2.9675638	-0.0487483	3.8056694	0.0487483	14.22
20	2.7584066				
25	2.5855191				
30	2.4869522				

## ANEXO 3: Fotos del proceso de determinación de actividad enzimática

### A. Preparación de solución de Alcohol Polivinílico al 2%



Se escogió alcohol polivinílico 100% hidrolizado para síntesis



Se pesó 5 g de alcohol polivinílico y se disolvió en 200 mL de agua a 80°C.



Se filtró con algodón y se aforó hasta 250 mL.

### B. Preparación de la emulsión



Se usaron 225 mL de alcohol polivinílico al 2% y 75 mL de aceite de oliva virgen.



Se usó una licuadora para homogenizar por 3 min y 20 segundos repitiendo tres veces y dejando reposar el 3 min.



Se dejó reposar por 1 hora, antes de usar a 10 °C.

### C. Proceso de Hidrólisis enzimática



Se agregó al minireactor con agitación magnética 50 mL de emulsión preparada y 40 mL de solución tampón citrato fosfato a pH 7.0



Luego se dejó reposar 37 °C por 10 minutos e inmediatamente después se agregó 10 mL de enzima preparada a las diferentes diluciones.



Se dejó hidrolizando durante 30 minutos a 37°C con agitación constante.



Terminada la reacción se sacó 5 mL de muestra.



Se detuvo la reacción con 5 mL de solución acetona:etanol dilución 1:1.



Se tituló con NaOH a 0.05N y se anotaron los valores obtenidos para cada dilución.

#### ANEXO 4: Hidrólisis enzimática del aceite semi-refinado de anchoveta



Se realizó el pesado de los insumos a usar, enzima, agua y aceite semi-refinado de anchoveta.



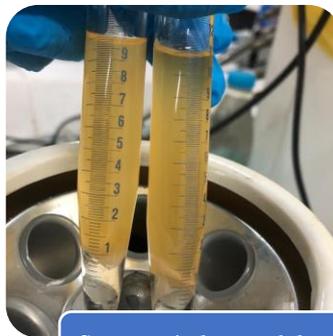
Se disolvió la enzima y el agua, luego se procedió a agregarlo en el minireactor a la temperatura de ensayo.



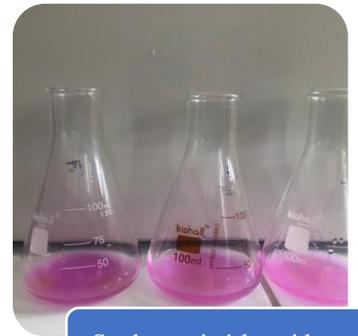
Luego se procedió a agregar el aceite semi-refinado de anchoveta, para comenzar la hidrólisis.



Después se procedió a parar la reacción, calentando a 60°C en baño María.



Se separó el agua del aceite, mediante centrifugación 3500 rpm por 10 minutos



Se determinó la acidez por triplicado por cada ensayo hidrolizado.

## ANEXO 5: concentración de AGPI en Aceite hidrolizado



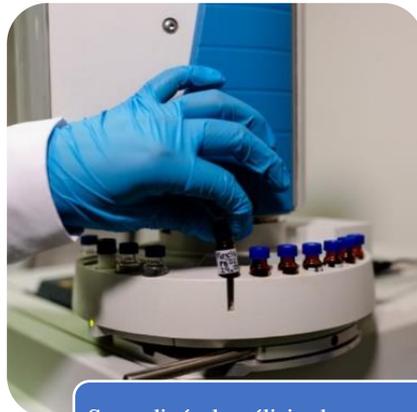
Se realizó un proceso de hibernación del aceite, para la separación por punto de fusión de los AGS.



Se filtró el aceite hibernado, en un disco filtrante de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ .



Se obtuvo el aceite concentrado, libre de turbidez por los AGS.



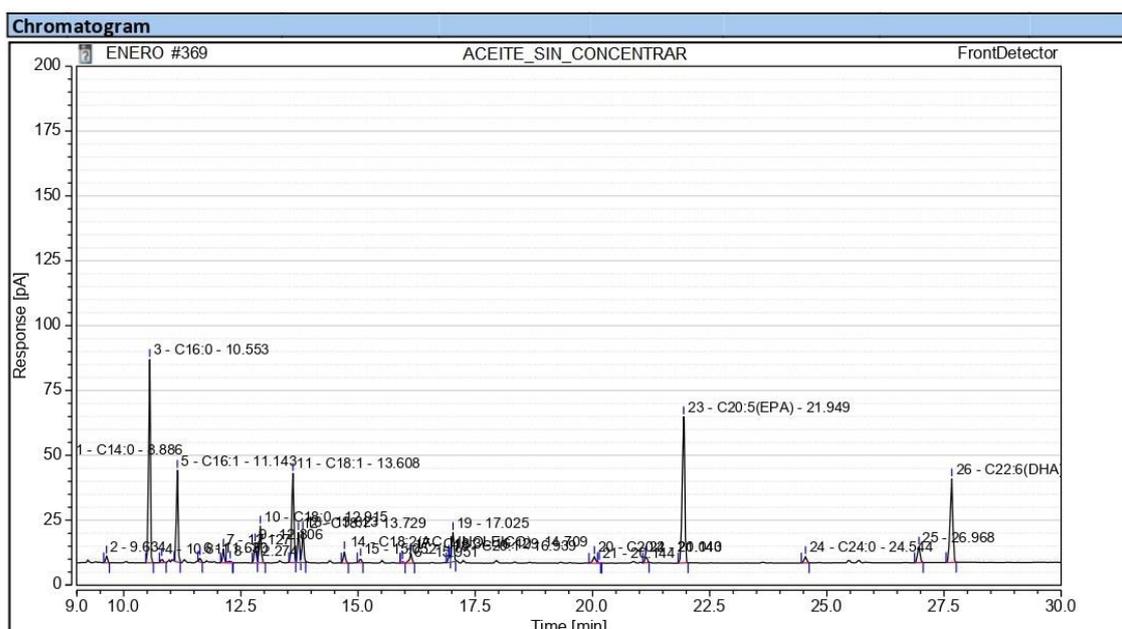
Se realizó el análisis de omegas para determinar la concentración de ácidos grasos del aceite concentrado.

## ANEXO 6: Cromatograma de ácidos grasos del aceite sin concentrar

Instrument:PC-PC\_1 Sequence:ENERO

Page 1 of 2

Chromatogram and Results			
Injection Details			
Injection Name:	ACEITE_SIN_CONCENTRAR	Run Time (min):	36.00
Vial Number:	2	Injection Volume:	1.50
Injection Type:	Unknown	Channel:	FrontDetector
Calibration Level:		Wavelength:	n.a.
Instrument Method:	FAMES	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	OCTUBRE-FAMES-2020	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	17/ene/21 10:40	Sample Weight:	1.0000



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area pA*min	Height pA	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	C14:0	8.886	1.538	39.899	8.29	10.75	n.a.
n.a.	C14:1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2		9.634	0.104	2.552	0.56	0.69	n.a.
3	C16:0	10.553	3.355	78.324	18.09	21.10	n.a.
4		10.811	0.074	1.616	0.40	0.44	n.a.
5	C16:1	11.143	1.504	35.334	8.11	9.52	n.a.
6		11.630	0.075	1.763	0.40	0.47	n.a.
7		12.127	0.245	5.319	1.32	1.43	n.a.
8		12.274	0.047	0.623	0.25	0.17	n.a.
9		12.806	0.336	7.305	1.81	1.97	n.a.
10	C18:0	12.915	0.682	14.164	3.68	3.82	n.a.
11	C18:1	13.608	1.686	34.335	9.09	9.25	n.a.
12	C18:1	13.729	0.541	11.538	2.92	3.11	n.a.
13		13.823	0.550	11.972	2.96	3.22	n.a.
14	C18:2(AC. LINOLEICO)	14.709	0.215	4.327	1.16	1.17	n.a.
15		15.052	0.081	1.654	0.43	0.45	n.a.
16		15.951	0.026	0.549	0.14	0.15	n.a.
n.a.	C20:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
17	C18:3	16.129	0.234	3.696	1.26	1.00	n.a.
18	C20:1	16.939	0.137	2.803	0.74	0.76	n.a.
19		17.025	0.574	11.259	3.09	3.03	n.a.

Default/Integration

Chromleon (c) Dionex  
Version 7.2.2.6394

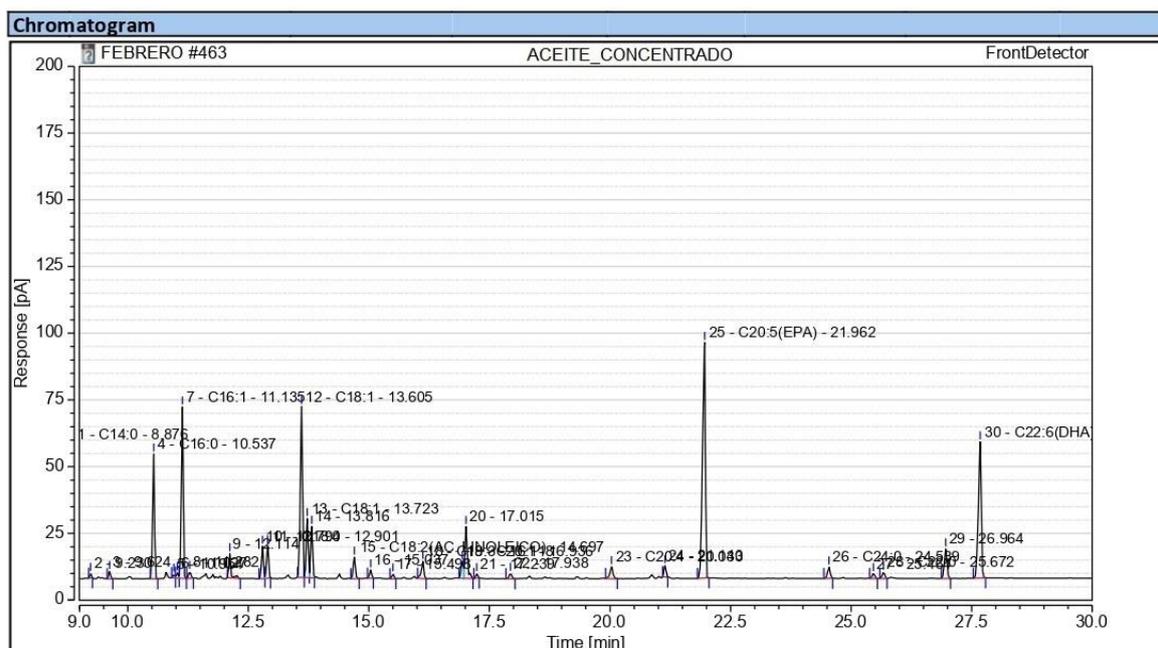
n.a.	C20:2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	C20:3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
20	C20:4	20.040	0.190	2.521	1.02	0.68	n.a.
21		20.144	0.005	0.146	0.02	0.04	n.a.
n.a.	C22:1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
22		21.143	0.145	2.532	0.78	0.68	n.a.
23	C20:5(EPA)	21.949	3.515	56.360	18.95	15.18	n.a.
n.a.	C23:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
24	C24:0	24.544	0.155	2.426	0.83	0.65	n.a.
n.a.	C22:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
25		26.968	0.397	6.078	2.14	1.64	n.a.
26	C22:6(DHA)	27.668	2.138	32.158	11.53	8.66	n.a.
<b>Total:</b>			<b>18.545</b>	<b>371.253</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	

## ANEXO 7: Cromatograma de ácidos grasos del aceite concentrado

Instrument:PC-PC\_1 Sequence:FEBRERO

Page 1 of 2

Chromatogram and Results		
Injection Details		
Injection Name:	ACEITE_CONCENTRADO	Run Time (min): 36.00
Vial Number:	4	Injection Volume: 1.50
Injection Type:	Unknown	Channel: FrontDetector
Calibration Level:		Wavelength: n.a.
Instrument Method:	FAMES	Bandwidth: n.a.
Processing Method:	OCTUBRE-FAMES-2020	Dilution Factor: 1.0000
Injection Date/Time:	08/feb/21 15:15	Sample Weight: 1.0000



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area pA*min	Height pA	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	C14:0	8.876	2.015	50.414	7.13	9.59	n.a.
2		9.230	0.063	1.705	0.22	0.32	n.a.
n.a.	C14:1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3		9.624	0.112	2.707	0.40	0.51	n.a.
4	C16:0	10.537	2.050	46.713	7.25	8.88	n.a.
5		10.954	0.055	1.364	0.19	0.26	n.a.
6		11.027	0.095	2.043	0.34	0.39	n.a.
7	C16:1	11.135	2.873	64.212	10.16	12.21	n.a.
8		11.282	0.148	2.518	0.52	0.48	n.a.
9		12.114	0.480	9.037	1.70	1.72	n.a.
10		12.794	0.561	12.031	1.98	2.29	n.a.
11	C18:0	12.901	0.589	12.119	2.08	2.30	n.a.
12	C18:1	13.605	3.338	64.003	11.81	12.17	n.a.
13	C18:1	13.723	1.056	22.051	3.73	4.19	n.a.
14		13.816	0.889	19.287	3.14	3.67	n.a.
15	C18:2(A.C. LINOLEICO)	14.697	0.407	8.018	1.44	1.52	n.a.
16		15.037	0.150	3.075	0.53	0.58	n.a.
17		15.498	0.087	1.737	0.31	0.33	n.a.
n.a.	C20:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
18	C18:3	16.118	0.386	6.362	1.37	1.21	n.a.
19	C20:1	16.936	0.315	6.307	1.11	1.20	n.a.

Default/Integration

Chromeleon (c) Dionex  
Version 7.2.2.6394

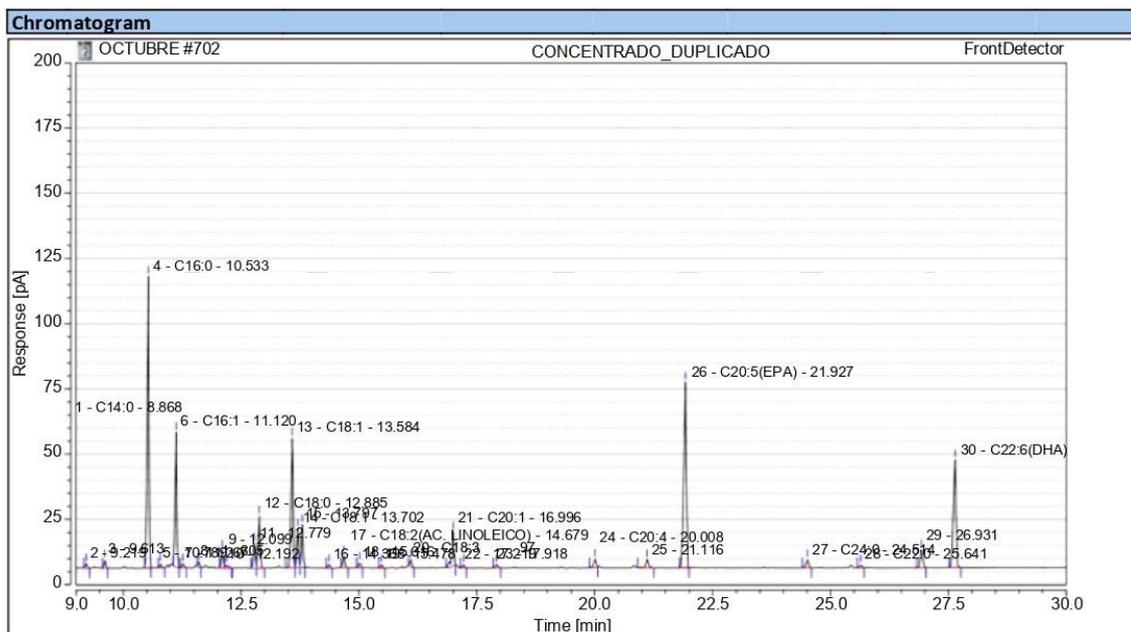
20		17.015	1.162	19.408	4.11	3.69	n.a.
21		17.239	0.080	1.663	0.28	0.32	n.a.
22		17.938	0.123	1.986	0.44	0.38	n.a.
n.a.	C20:2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	C20:3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
23	C20:4	20.033	0.317	4.457	1.12	0.85	n.a.
n.a.	C22:1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
24		21.140	0.218	4.121	0.77	0.78	n.a.
25	C20:5(EPA)	21.962	5.923	88.265	20.95	16.78	n.a.
n.a.	C23:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
26	C24:0	24.539	0.272	4.254	0.96	0.81	n.a.
27		25.464	0.114	1.789	0.40	0.34	n.a.
28	C22:0	25.672	0.143	2.281	0.51	0.43	n.a.
29		26.964	0.719	11.025	2.54	2.10	n.a.
30	C22:6(DHA)	27.681	3.535	51.007	12.50	9.70	n.a.
<b>Total:</b>			<b>28.279</b>	<b>525.963</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	

## ANEXO 8: Cromatograma de ácidos grasos del aceite concentrado duplicado

Instrument:PC-PC\_1 Sequence:OCTUBRE

Page 1 of 2

Chromatogram and Results			
<b>Injection Details</b>			
Injection Name:	CONCENTRADO_DUPLICADO	Run Time (min):	36.00
Vial Number:	2	Injection Volume:	1.50
Injection Type:	Unknown	Channel:	FrontDetector
Calibration Level:		Wavelength:	n.a.
Instrument Method:	FamesCamarMAY2018	Bandwidth:	n.a.
Processing Method:	OCTUBRE-FAMES	Dilution Factor:	1.0000
Injection Date/Time:	07/oct/21 16:20	Sample Weight:	1.0000



Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area pA*min	Height pA	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	C14:0	8.868	2.015	56.932	8.56	9.59	n.a.
2		9.219	0.063	1.710	0.30	0.32	n.a.
n.a.	C14:1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3		9.613	0.112	3.154	0.50	0.51	n.a.
4	C16:0	10.533	2.050	46.713	7.28	8.88	n.a.
5		10.789	0.055	1.364	0.19	0.26	n.a.
6		11.027	0.095	2.043	0.34	0.39	n.a.
7	C16:1	11.135	2.873	64.212	10.14	12.21	n.a.
8		11.282	0.148	2.518	0.52	0.48	n.a.
9		12.114	0.480	9.037	1.70	1.72	n.a.
10		12.794	0.561	12.031	1.98	2.29	n.a.
11	C18:0	12.901	0.589	12.119	2.06	2.30	n.a.
12	C18:1	13.584	3.338	64.003	11.80	12.17	n.a.
13	C18:1	13.702	1.056	22.051	3.74	4.19	n.a.
14		13.816	0.889	19.287	3.14	3.67	n.a.
15	C18:2(AC. LINOLEICO)	14.679	0.407	8.018	1.45	1.52	n.a.
16		15.037	0.150	3.075	0.53	0.58	n.a.
17		15.498	0.087	1.737	0.33	0.33	n.a.
n.a.	C20:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
18	C18:3	16.118	0.386	6.362	1.40	1.21	n.a.
19	C20:1	16.936	0.315	6.307	1.20	1.20	n.a.

Default/Integration

Chromeleon (c) Dionex  
Version 7.2.2.6394

20		17.015	1.162	19.408	4.11	3.69	n.a.
21		17.239	0.080	1.663	0.28	0.32	n.a.
22		17.938	0.123	1.986	0.44	0.38	n.a.
n.a.	C20:2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a.	C20:3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
23	C20:4	20.033	0.317	4.457	1.11	0.85	n.a.
n.a.	C22:1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
24		21.140	0.218	4.121	0.77	0.78	n.a.
25	C20:5(EPA)	21.927	5.923	88.265	20.98	16.78	n.a.
n.a.	C23:0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
26	C24:0	24.514	0.272	4.254	0.97	0.81	n.a.
27		25.464	0.114	1.789	0.40	0.34	n.a.
28	C22:0	25.641	0.143	2.281	0.50	0.43	n.a.
29		26.931	0.719	11.025	2.57	2.10	n.a.
30	C22:6(DHA)	27.643	3.535	51.007	12.70	9.70	n.a.
<b>Total:</b>			<b>28.279</b>	<b>525.963</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	



## DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo GREISSY STEFHANY ENCINAS ESTRADA  
estudiante de la

Facultad:	Ciencias		Educación		Ingeniería	x
Escuela Profesional:	Ingeniería Agroindustrial					
Departamento Académico:	Agroindustria y Agronomía					
Escuela de Posgrado	Maestría			Doctorado		

Programa:  
De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación titulado:

“OBTENCIÓN DE AGPI n-3 POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE ACEITE SEMI-REFINADO DE ANCHOVETA (*Engraulis ringens*)”

presentado en 10 folios, para la obtención del Grado académico:	( )		
Título profesional:	( X )	Investigación anual:	( )

- He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.
- Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.
- Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.
- De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.

Nuevo Chimbote, 16 de junio de 2021

Firma:



Nombres y Apellidos: GREISSY STEFHANY ENCINAS ESTRADA

DNI: 72030257

**NOTA: Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesis e investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.**

TESIS por Greissy Steffany Encinas Estrada

Desde AGROINDUSTRIAL (PREGRADO - AGROINDUSTRIA)

Índice de similitud  <b>20%</b>	<b>Similitud según fuente</b>
	Internet Sources: 21%
	Publicaciones: 3%
	Trabajos del estudiante: 5%

Procesado el 10-sept.-2021 11:13 a. m.  
-05

Identificador: 1138516966

Número de palabras: 25977

**fuentes:**

- 1

4% match ( )

[León Vásquez, Susán Carolina, Sifuentes Penagos, Gabriel Omar. "Estudio de la hidrólisis de proteínas en anchoveta entera \(Engraulis ringens\) por acción enzimática.", Universidad Nacional del Santa, 2017](#)
- 2

4% match ( )

[Campos Grijalva, Ashley Kiara. "Optimización de la temperatura de secado y presión de vacío en la decoloración del aceite crudo de pescado", Universidad Nacional del Santa, 2017](#)
- 3

3% match ( )

[Cortez Ibañez, Diana, Huerta Chauca, Jessica. "Efecto de los antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite de pescado crudo industrial", Universidad Nacional del Santa, 2015](#)
- 4

2% match ( )

[Ardiles Falcón, Natalia Elena, Mozo Malca, Vanessa Janeel. "Determinación del tiempo de vida útil del aceite crudo de pescado usando antioxidantes sintéticos y naturales mediante uso del Rancimat", Universidad Nacional del Santa, 2017](#)
- 5

1% match ( )

[Estrada Talexi, William Ronald, Estrada Talexcio, Julissa Noemí. "Influencia de los parámetros del rancimat en el tiempo de inducción y perfil de ácidos grasos del aceite de chía \(salvia hispánica l.\) cultivada en el distrito de Andahuaylas", Universidad Nacional del Santa, 2016](#)
- 6

1% match (Internet desde 20-ene.-2021)

<http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/2983/46308.PDF?sequence=>
- 7

1% match ( )

[Lizano Chehin, Omar Anthony. "Caracterización Bioquímica de la actividad Lipolítica de Pseudoalteromonas Atlantica Aislada de la Bahía de Paracas", Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2012](#)
- 8

1% match (Internet desde 25-abr.-2020)

[http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v19n3/es\\_0122-8706-ccta-19-03-645.pdf](http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v19n3/es_0122-8706-ccta-19-03-645.pdf)
- 9

1% match (Internet desde 29-nov.-2020)

[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?lng=en&nrm=iso&pid=S0717-75182014000200012&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?lng=en&nrm=iso&pid=S0717-75182014000200012&script=sci_arttext&tlng=en)

10

< 1% match ()

[Cortez Cortez, Danco Genaro, Sánchez Carbajal, Esther Elizabeth. "Evaluación de la estabilidad oxidativa de la mezcla de aceites de Chia \(Salvia hispánica L.\) y Ajonjolí \(Sesamum indicum L.\)", Universidad Nacional del Santa, 2017](#)

---

11

< 1% match (Internet desde 07-feb.-2018)

<http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/2992/42905.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

---

12

< 1% match ()

[Arias Nuñuvero, John Oscar, Lopez Carranza, Nelly Aurora. "Estabilidad oxidativa y perfil de ácidos grasos del aceite de semilla de lino \(linum usitatissimum\) procedentes de corongo y otuzco, extraído por prensado en frío.", Universidad Nacional del Santa, 2015](#)

---

13

< 1% match (Internet desde 09-oct.-2018)

<https://docplayer.es/9738012-Los-beneficios-para-la-salud-de.html>

---

14

< 1% match (Internet desde 23-jul.-2020)

<https://docplayer.es/44529718-Norma-mexicana-nmx-f-017-scfi-2011.html>

---

15

< 1% match (Internet desde 18-jul.-2020)

[https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/127824/TG\\_GarciaEstebanS\\_Lipasasmicrobianas.pdf?sequence=1](https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/127824/TG_GarciaEstebanS_Lipasasmicrobianas.pdf?sequence=1)

---

16

< 1% match (Internet desde 05-may.-2016)

<http://www.buenastareas.com/materias/principios-y-aplicaciones-de-la-cromatografia-de-gases/0>

---

17

< 1% match (Internet desde 12-may.-2021)

<https://ninive.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/7153/TesisM.FCQ.2020.An%c3%a1lisis.Monsiv%c3%a1is%28v%29.pdf?isAllowed=y&sequence=6>

---

18

< 1% match (Internet desde 18-abr.-2020)

<https://pt.scribd.com/document/377668867/004-2-1-022>

---

19

< 1% match (Internet desde 30-nov.-2020)

<https://qdoc.tips/tesis-de-aceite-de-pescado-word-pdf-free.html>

---

20

< 1% match (Internet desde 19-feb.-2021)

<https://es.scribd.com/document/423124384/T-UCE-0008-098>

---

21

< 1% match ()

[Castro Huamán, Luz Katherine, Zegarra Chavez, Juan Andres. "Enriquecimiento de la carne de pollo con ácidos grasos omega-3 mediante la suplementación de las dietas con semilla de lino \(Linum usitatissimum L.\) y su conservación en envasado al vacío", 'Baishideng Publishing Group Inc.', 2020](#)